



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

FACULDADE
DE
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANA CATARINA DA CRUZ GOMES GRAVETO

***POLIGLOBULIAS – O QUE APRENDEMOS SOBRE ELAS NOS
ÚLTIMOS ANOS?***

REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
DOUTORA TABITA MAGALHÃES MAIA
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO

ABRIL/2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Ana Catarina da Cruz Gomes Graveto

**POLIGLOBULIAS – O QUE APRENDEMOS SOBRE ELAS NOS
ÚLTIMOS ANOS?**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina, incluindo hematologia,
orientada pela Doutora Tabita Pilar Bernardo Magalhães Ascenso Maia e co-orientada pela
Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro

Abril 2019

Índice

RESUMO	3
ABSTRACT	3
AGRADECIMENTOS	4
ABREVIATURAS	6
INTRODUÇÃO.....	7
MÉTODOS	10
ERITROCITOSE CONGÉNITA PRIMÁRIA	12
MUTAÇÕES NO RECETOR DE ERITROPOETINA	12
ERITROCITOSE CONGÉNITA SECUNDÁRIA.....	14
VIA DE SENSIBILIDADE DO OXIGÉNIO.....	14
<i>Mutação VHL – Congenital erythrocytosis type 2 (ECYT 2)</i>	14
<i>Mutação PHD2 – Congenital erythrocytosis type 3 (ECYT 3)</i>	15
<i>Mutação HIF – congenital erythrocytosis type 4 (ECYT 4)</i>	16
AUMENTO DA AFINIDADE DE O ₂	17
<i>Hemoglobinas de alta afinidade</i>	17
<i>Diminuição da atividade da bifosfoglicerato mutase</i>	18
CLÍNICA.....	20
DIAGNÓSTICO	22
TRATAMENTO.....	26
CONCLUSÃO	28
BIBLIOGRAFIA	30

Resumo

As eritrocitoses ou poliglobulia são patologias caracterizadas por um aumento do hematócrito (Htc) e do valor de hemoglobina (Hb) acima dos valores normais de referência, associado a um aumento da massa de eritrócitos no sangue periférico. De acordo com os mecanismos fisiopatológicos e os níveis de eritropoetina (EPO) podem classificar-se em eritrocitoses primárias ou eritrocitoses secundárias. Na eritrocitose primária existe um defeito intrínseco nas células precursoras eritroides e uma hipersensibilidade das mesmas à EPO. Na eritrocitose secundária há um aumento da produção de EPO ou um valor incorretamente normal de EPO para os valores de Htc. As eritrocitoses em que não se consiga perceber a sua etiologia são classificadas como idiopáticas. Para além disso, as eritrocitoses podem ser, ainda, divididas em congénitas ou adquiridas, sendo as adquiridas as mais frequentes. De entre todas, as eritrocitoses secundárias adquiridas são as mais comuns e a sua etiologia é mais facilmente identificada. Com este trabalho pretende-se distinguir as várias eritrocitoses congénitas e criar um algoritmo de diagnóstico que permita uma avaliação e identificação etiológica rápida e eficaz com base na literatura e conhecimentos atuais.

Abstract

Erythrocytosis or polycythemia are pathologies characterized by an increase in hematocrit (Htc) and hemoglobin (Hb) above normal reference values, associated with an increase in the erythrocyte mass in the peripheral blood. According to the pathophysiology mechanisms and levels of erythropoietin (EPO) they can be classified into primary erythrocytosis and secondary erythrocytosis. In primary erythrocytosis there is an intrinsic defect in the erythroid percussive cells, and a hypersensitivity of the erythroid progenitor cells to EPO. In secondary erythrocytosis there is an increase in EPO production or an abnormally normal EPO value for Htc values. All those in which it is not possible to perceive its etiology are classified as idiopathic. In addition, erythrocytosis may be further divided into congenital or acquired, and those acquired are far more frequent than those congenital. Among all, the secondary acquired erythrocytosis are the most common and those whose etiology is more easily identified. The aim of this study is to distinguish the various congenital erythrocytosis and to create a diagnostic algorithm that allows rapid and effective evaluation and identification of their etiology based on the literature and current knowledge.

Agradecimentos

Escrever os agradecimentos da tese provou-se mais difícil do que escrever a tese em si. Talvez porque parece que marca o fim de uma longa luta para alcançar um sonho, talvez porque nunca esperei que acabasse assim, talvez porque não soubesse bem como agradecer devidamente a quem teve efetivamente um papel determinante na realização deste percurso ou ainda, talvez porque sentia que não tinha que agradecer a ninguém, que queria ver o meu mérito reconhecido por isso mesmo, por ser meu. Parando para pensar as palavras começaram a sair e os agradecimentos não pararam de sair.

Agradeço-te a ti, avô, porque grande parte do que eu sou devo cem por cento a ti. Ensinaste-me a nunca desistir, a nunca parar de lutar, por mais negras que as coisas estivessem. Fizeste-me prometer que continuava mesmo não estando tu aqui para me ver chegar ao fim. Ajudaste-me a crescer e a ser quem sou hoje. Não te preocupes, que eu perdoo-te por não estares aqui para ver este momento apesar de teres prometido, porque eu sei que só aqui cheguei graças a ti e que sei que ainda vou chegar muito mais longe, porque tu me deste todas as ferramentas para eu conseguir.

Agradeço-te a ti, mano, por teres sido o meu companheiro de viagem em todos os momentos. Por teres sido a única pessoa que sabia exatamente o que se estava a passar comigo e por juntos termos conseguido dar a volta a tudo, mesmo quando achei que já não havia solução.

Agradeço-te a ti, mãe, por não teres desistido de ti e por teres conseguido estar bem para agora me ajudares a cruzar esta meta. Agradeço-te a ti, pai, por teres tido força mesmo quando eu não tive e me teres apoiado incondicionalmente e acreditado em mim, mesmo quando parecia que eu estava a desistir e a fazer a coisa errada.

Agradeço-te a ti, avó, por teres feito o avô tão feliz como fizeste e teres cuidado tão bem dele. Tão bem, que eu tive tempo para me concentrar em acabar esta tese e este curso, segura de que tudo ia correr bem graças a ti. Agradeço-te a ti, inha, por teres sido o meu porto seguro, o sítio para onde eu fugia sempre que tudo era demais, para me recompor e voltar a tentar, porque um dia tudo melhora.

Agradeço-te a ti, Filipa, porque nunca paraste de acreditar em mim, porque sempre viste em mim o que nem eu via em mim própria. Agradeço-te a ti, Rafa, porque apesar de tarde neste percurso, surgiste nos momentos mais difíceis e não me deixaste parar, empurraste-me a continuar até eu chegar ao fim. Agradeço-te a ti, Dorina, porque

mesmo quando ainda não era um palmo de gente, já me dizias que ia mudar o mundo e que tinha mais força em mim do que qualquer pessoa à minha volta e foram essas palavras que me iluminaram o caminho quando achei que estava perdida.

Agradeço-lhe a si, Doutora Tabita, por ter conseguido que o meu lado mais resiliente e decidido viesse ao de cima e me ter apoiado neste percurso para que esta tese fosse possível, mesmo nos momentos em que eu não o mereci.

Agradeço a todos os professores que ao longo de toda a minha vida académica acreditaram em mim e me ajudaram a ser melhor, a querer mais, a chegar a este momento. Agradeço, também, a todos aqueles que não acreditaram, nem me deram oportunidade de lhes provar que estavam errados, porque só me fizeram querer isto ainda mais e me levaram a dedicar-me ainda mais de alma e coração ao meu sonho.

E não podia deixar de te agradecer, outra vez a ti, avô, porque no dia em que esta vitória se concretizar eu dedico-a toda a ti. À minha luz, ao meu farol, à minha estrela na noite, que nunca me abandonou e que nunca me deixou desistir. Adoro-te avô e tudo o que sou, sou-o também por ti.

“Uma vida sem desafios, não vale a pena ser vivida” - Sócrates

Abreviaturas

Hb – Hemoglobina

Htc - hematócrito

EPOR – recetor de eritropoetina

EPO – eritropoetina

JAK2 – janus kinase 2

VHL – von Hippel-Lindau

HIF – hipoxia-inducible factor

PHD – prolyl hydroxylase domain

BPGM - bifosfoglicerato mutase

PKLR – piruvato quinase

BFUE - unidades de formação colónias eritroide

STAT5 – signal transducer and activator of transcription 5

SHP 1 – tyrosine-protein phosphatase 1

ECYT1 – eritrose congénita tipo 1

ECYT 2 – eritrocitose congénita tipo 2

ECYT 3 – eritrocitose congénita tipo 3

ECYT 4 – eritrocitose congénita tipo 4

HRE - genes de fatores de resposta à hipoxias

ATP - adenosina trifosfato

RUNX1 - Runt-related transcription factor 1

NF-E2 – nuclear factor – erythroid 2

EGLN1 - Egl nine homolog 1

HBB – gene das cadeias beta globinicas

HBA1 – Gene das cadeias alfa globinicas

HBA2 - Gene das cadeias alfa globinicas

2,3-BPG – 2,3-bifosfoglicerato

Introdução

As eritrocitoses ou poliglobulias, segundo a Organização Mundial de Saúde, são patologias caracterizadas por um aumento do hematócrito (Htc) e do valor de hemoglobina (Hb) acima dos valores de referência, para o sexo, idade e altitude, associado a um aumento da massa de eritrócitos no sangue periférico. Uma eritrocitose absoluta ocorre quando a massa de eritrócitos é 125% do valor normal ou quando há um aumento dos valores de Hb e do hematócrito, obtidos em medições realizadas em duas colheitas diferentes. Uma pseudo eritrocitose ou eritrocitose aparente é provocada por uma depleção de volume plasmático causada, por exemplo, por diuréticos ou diarreia e/ou vômitos severos, em que há uma depleção do volume plasmática sem que haja perda de massa eritrocitária. Por fim, uma eritrocitose relativa, ocorre como reação a uma hipoxia arterial, em que há um consequente aumento da massa eritrocitária para compensar as necessidades de oxigénio nos tecidos.¹ De acordo com os mecanismos fisiopatológicos e os níveis de eritropoetina (EPO), as eritrocitoses podem classificar-se em primárias ou secundárias. Ambas podem ser adquiridas ou congénitas. Todas as eritrocitoses em que não se consiga perceber a etiologia (Tabela 1) são classificadas como idiopáticas.²

TABELA 1 - CAUSAS DE ERITROCITOSE

Eritrocitose Primária
<p>Congénita</p> <ul style="list-style-type: none">Mutação no EPOR – Eritrocitose Congénita tipo 1Mutação no gene LNK <p>Adquirida</p> <ul style="list-style-type: none">Policitémia Vera – Mutação no gene JAK2
Eritrocitose Secundária
<p>Congénita</p> <p>Alterações na via da sensibilidade de oxigénio</p> <ul style="list-style-type: none">Mutação no VHL – Eritrocitose Congénita tipo 2Mutação no PHD2 – Eritrocitose Congénita tipo 3Mutação no HIF – Eritrocitose Congénita tipo 4 <p>Aumento da afinidade pelo oxigénio</p> <ul style="list-style-type: none">Hemoglobina de alta afinidadeDéfice de bifosfoglicerato mutase <p>Adquirida</p>

<p>Provocada por hipóxia</p> <p>Processo de hipoxia central</p> <p>Hipóxia renal</p> <p>Produção EPO patológica</p> <p>Aumento de EPO exógena</p>
Eritrocitose Idiopática

Na eritrocitose primária existe um defeito intrínseco às células precursoras eritroides, que, geralmente, cursa com valores baixos de EPO e uma hipersensibilidade das células eritroides progenitoras eritroides há mesma. Na eritrocitose secundária há um aumento da produção de EPO ou um valor inapropriadamente normal para os valores de Htc encontrados. A eritrocitose secundária pode ocorrer como resposta fisiológica a uma hipoxia tecidual ou arterial ou como consequência de um mecanismo patológico que aumente os valores de EPO.³ Por fim, existem as eritrocitoses idiopáticas, onde não é identificada claramente uma causa ou mecanismo fisiopatológico. As eritrocitoses idiopáticas ainda são representativas da maioria dos casos, cerca de 70%,⁴ apesar de sua prevalência ter vindo a diminuir com a identificação de novas mutações causadoras de eritrocitose.⁵

A eritrocitose primária adquirida é a Policitemia Vera (PV) e ocorre quando há uma mutação provocadora de ganho de função na proteína janus kinase 2 (JAK2), o que promove uma ativação constante da via de sinalização da EPO a nível dos recetores de eritropoetina (EPOR). A eritrocitose primária congénita é provocada ou por uma mutação autossómica dominante no gene do EPOR com ganho de função do mesmo ou por uma mutação no gene *LNK*, que regula a função do JAK2, mantendo-se este sempre fosforilado e sinalizado.⁶

A maioria das eritrocitoses são secundárias e, a maioria destas, são adquiridas. As eritrocitoses secundárias adquiridas são provocadas por causas extrínsecas ao compartimento eritroide, como: doenças causadoras de hipoxia tecidual (por exemplo, insuficiência cardíaca ou insuficiência respiratória); situações de hipóxia arterial como o tabagismo; tumores produtores de EPO. As eritrocitoses congénitas secundárias podem ter como etiologia alterações nas proteínas reguladoras da via de sensibilidade do oxigénio, como mutações nos genes da proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (VHL), nos genes da proteína HIF (hipoxia-inducible factor) e nos genes da proteína reguladora do HIF (prolyl hydroxylase domain 2 – PHD2); ou por aumento na afinidade

da Hb para o oxigénio, como ocorre nas hemoglobinas de alta afinidade, no défice de bifosfoglicerato mutase (BPGM).⁷

Tendo em conta a heterogeneidade das manifestações clínicas das eritrocitoses congénitas e a dificuldade, ainda existente, em identificar a sua etiologia na maioria dos casos, com este trabalho pretende-se distinguir as várias eritrocitoses congénitas e criar um algoritmo de diagnóstico que permita a sua avaliação e identificação etiológica rápida e eficaz. A identificação da etiologia e classificação da eritrocitose permite um melhor acompanhamento do doente, com tratamentos dirigidos, permitindo, assim, uma maior qualidade de vida e uma diminuição de complicações a longo prazo, como eventos tromboembólicos ou hipertensão arterial e pulmonar.

Métodos

O objetivo primário desta tese é reunir informação sobre as eritrocitose congénitas e idiopáticas, de forma a permitir uma perceção do estado da arte atual e, com base no mesmo, criar um algoritmo de diagnóstico atualizado que contribua positivamente para a identificação de um maior número de etiologias da eritrocitose.

Como fonte de informação foram pesquisadas as bases de dados Pubmed, B-On, Embase, Agency for healthcare research and quality e Web of Science. A equação de pesquisa utilizada foi: “Congenital erythrocytosis AND Diagnosis AND/OR Treatment”, sendo as palavras chave utilizadas: “Congenital erythrocytosis”, “diagnosis” e “treatment”. A pesquisa decorreu entre 1 de Junho de 2018 e 30 de Novembro de 2018.

O critérios de inclusão dos estudos consistiram em:

- Estudos publicados entre janeiro de 2008 e novembro de 2018;
- Estudos randomizados e controlados;
- Estudos de caso;
- Artigos clássicos;
- Clinical studies e clinical trials;
- Guidelines e practice guidelines;
- Estudos publicados em inglês;
- Estudos publicados com texto completo;

Estudos em humanos;

Foram considerados como critérios de exclusão:

- Ausência de qualidade dos estudos publicados, concluída através da análise dos mesmos pela checklist de SING (sendo admissível a complementação da informação com artigos já publicados, registo do estudo ou protocolo deste e a ausência de algumas informações em estudos publicados mas com resultados preliminares);
- Estudos que apesar de fazerem referências às eritrocitoses congénitas não se focaram nesta patologia como principal tema (com exceção de guidelines de policitemia vera, que permitam distinguir a mesma da eritrocitoses congénitas).

A seleção dos estudos foi feita através da análise dos artigos cujos títulos e/ou resumos foram recuperados através da estratégia de pesquisa e que iam de encontro aos critérios de inclusão já referidos, com base no fluxo grama PRISMA 2009.

Foi extraída informação sobre o artigo em si, como o nome dos autores, título da publicação, jornal em que foi publicado, ano da publicação, objetivos do estudo e parâmetros avaliados e participantes nos estudos, bem como sobre os resultados de interesse. A informação em falta foi consultada nos protocolos e artigos prévios dos

estudos incluídos na revisão, não tendo sido necessário requisitá-la aos autores do estudo. Os dados recolhidos foram sintetizados e tratados nesta tese, com o objetivo final de criar um algoritmo de diagnóstico de eritrocitoses viável.

A pesquisa da literatura nas múltiplas bases de dados referidas contribui para a redução do risco de viés na elaboração desta revisão sistemática, bem como a seleção dos artigos pela checklist de SING e pelo fluxograma da PRISMA 2009 (Figura I).

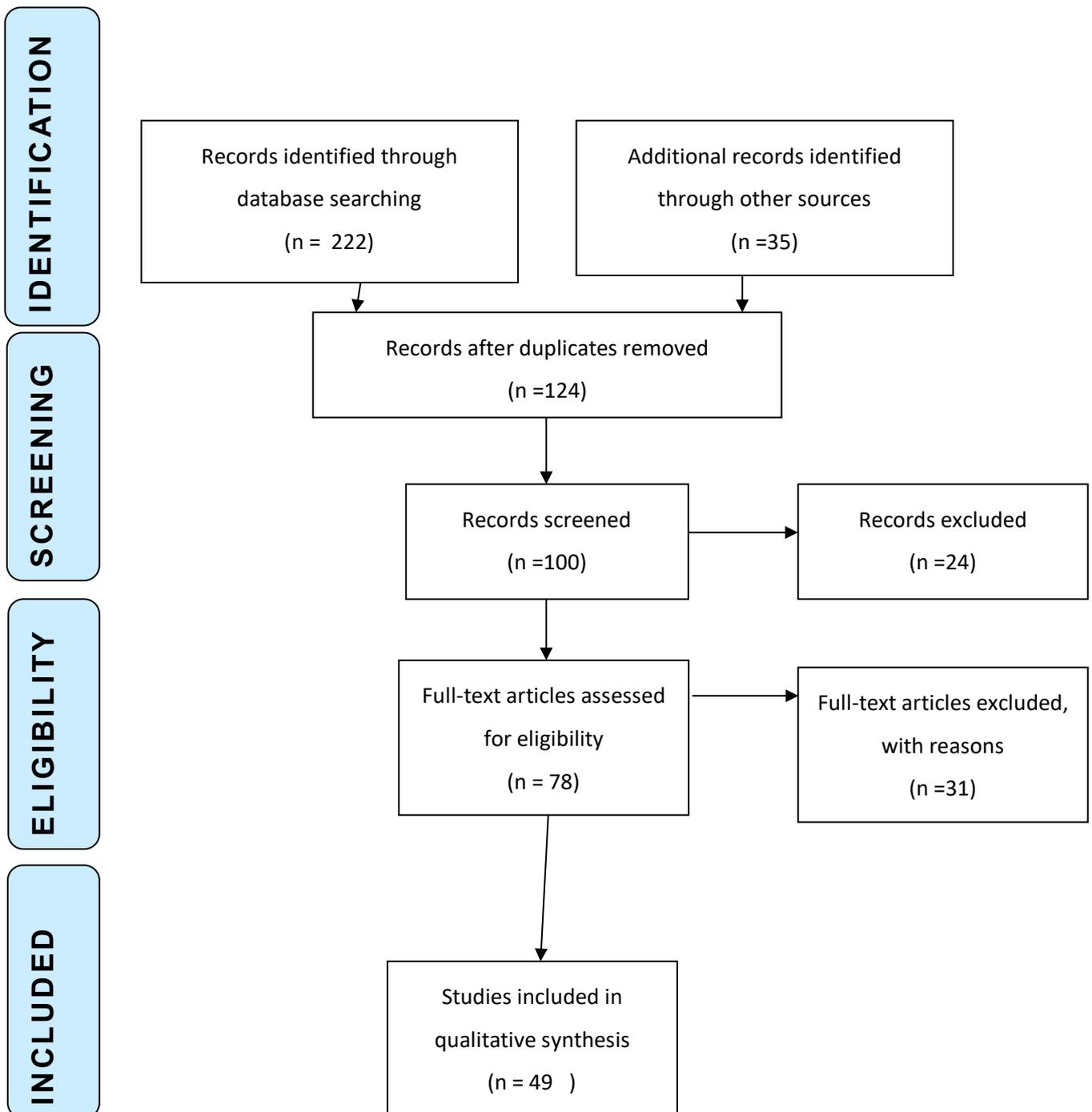


FIGURA I - FLUXOGRAMA PRISMA 2009

Eritrocitose Congénita Primária

Mutações no Recetor de Eritropoetina

A eritropoese inicia-se quando a EPO se liga ao EPOR, um recetor de membrana das células precursoras eritroides, as unidades de formação de colónias eritroides (BFU_E), estimulando a sua divisão e diferenciação e promovendo a produção eritrocitária (Figura II). As proteínas JAK2, existentes na porção intracitoplasmática do EPOR, perante o estímulo da EPO, unem-se uma à outra, autofosforilam-se e fosforilam as tirosinas existentes nesta região do recetor. Este mecanismo de fosforilação da porção intracitoplasmática do EPOR permite a ligação do fator de ativação do fator de transcrição 5 (STAT5) e a sua homodimerização. Quando homodimerizado, o STAT5 transloca-se para o núcleo e estimula a transcrição de genes de proliferação e diferenciação da BFU_E e de genes anti-apoptóticos, iniciando-se, assim, a eritropoese.⁸ Aproximadamente 30 minutos após a ligação da EPO ao EPOR, a *tyrosine-protein phosphatase 1* (SHP1) é recrutada. Esta proteína promove a separação das duas proteínas JAK2, a consequente desfosforilação do EPOR e, posteriormente, a sua ubiquitinação. Quando ubiquitinado, o EPOR é degradado pelo proteasoma o que leva à regulação negativa da eritropoese.⁹

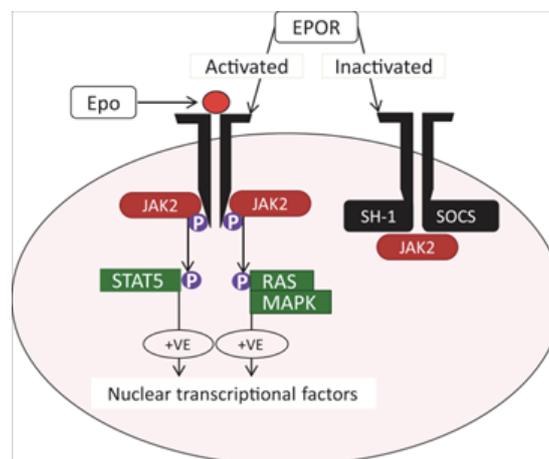


FIGURA II – VIA DO EPOR E DO JAK2-STAT: A VIA É ATIVADA QUANDO A EPO SE LIGA, PERMITINDO A FOSFORILAÇÃO DO JAK2 E, ASSIM, ATIVANDO O STAT5 E A VIA RAS-MAPK DE TRADUÇÃO, QUE POR SUA VEZ, ATIVA FATORES DE TRANSCRIÇÃO NUCLEARES PROMOTORES DA PROLIFERAÇÃO DOS PERCURSORES ERITROÍDES. QUANDO ESTÁ INATIVA RECRUTA TIROSINA FOSFATASE (SHP-1) E UM SUPRESSOR DA SINALIZAÇÃO (LNK) FACILITA A DESFOSFORILAÇÃO DO JAK2.⁹

Na eritrocitose congénita primária ou eritrocitose congénita tipo 1 (ECYT1) estão descritas várias mutações no EPOR (exão 8 e 7 do cromossoma 19)^{2,7} de transmissão autossómica dominante. Estas mutações fazem com que o EPOR fique truncado no seu domínio intracitoplasmático, no local de ligação do SHIP1, mantendo-se a proteína JAK2 preservada. Esta alteração faz com que a eritropoese se inicie, a partir da autofosforilação do JAK2, perante o estímulo de EPO e consequente início da cascata de fosforilação. O mecanismo de regulação negativa, com a ligação do SHIP1, não é possível e, por isso, há uma produção contínua de eritrócitos, independente dos valores de EPO, que nestas situações são caracteristicamente baixos⁴. Há, por isso mesmo, também, uma hipersensibilidade concomitante para a EPO, cujos valores séricos baixos são suficientes para uma elevada estimulação da eritropoese.¹

Eritrocitose Congénita Secundária

Via de Sensibilidade do oxigénio

Mutação VHL – Congenital erythrocytosis type 2 (ECYT 2)

A proteína de von Hippel-Lindau (VHL) é uma componente de reconhecimento da proteína ubiquitina-ligase do complexo E3, que medeia a degradação, pelo proteasoma, da sub-unidade α do HIF-1 em condições de normóxia, deixando-a estável em situações de hipoxia (Figura III).^{8,10} O HIF-1 é o principal fator ativador de transcrição em células com hipoxia porque promove a transcrição da EPO e outros genes. Em situações de normóxia, se o HIF-1 não for degradado, há um aumento dos níveis de EPO plasmática e consequente aumento do hematócrito.¹¹

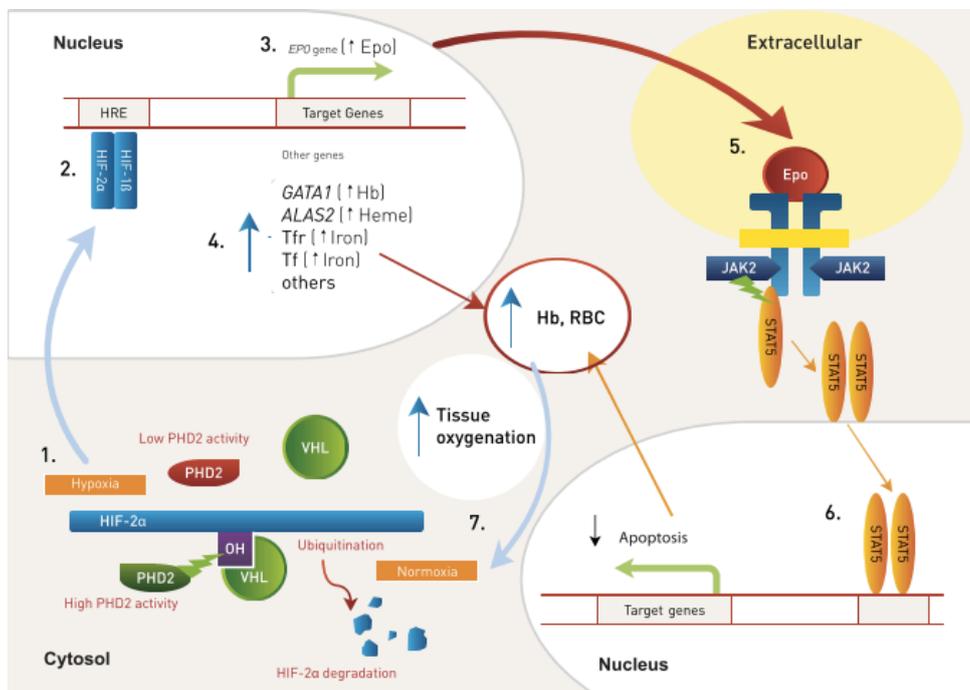


FIGURA III – REPRESENTAÇÃO DOS GENES E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA VIA DE SENSIBILIDADE DO OXIGÉNIO. (1) EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA, HIF-2 α É HIDROXILADO PELO PHD2, QUE PERMITE A LIGAÇÃO DO PVHL, FACILITANDO A UBIQUITINAÇÃO DO HIF-2 α . EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA, A AÇÃO DO PHD2 É INIBIDA E HÁ ACUMULAÇÃO DE HIF-2 α . (2) NO NÚCLEO O HIF-2 α DIMERIZA COM O HIF-2 β E LIGA-SE AO ELEMENTO DE RESPOSTA À HIPÓXIA CIS (HRE) NA REGIÃO TERMINAL 3' DOS GENES ALVO. (3) ERITROPOIESE INDUZIDA POR HIPÓXIA ESTIMULA A PRODUÇÃO DE EPO. (4) A LIGAÇÃO HIF-HRE ATIVA A TRANSCRIÇÃO DE GENES ALVO, PROMOVENDO A SÍNTESE DE HEMOGLOBINA HEME E A ABSORÇÃO DE FERRO. (5) A LIGAÇÃO DA EPO AO EPOR PERMITE A FOSFORILAÇÃO DO JAK2 E ATIVA A VIA INTRACELULAR DO STAT5 (6) HÁ INDUÇÃO DOS PERCURSORES ERITROIDES, FATORES ANTIAPOTÓSE E OUTROS FATORES CITOQUÍNICOS QUE PERMITEM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ERITROIDES E RESTAURAR A OXIGENAÇÃO AOS

TECIDOS. (7) EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA O HIF-2 α É HIDROXILADO PELO PHD2, QUE FACILITA A SUA UBIQUITINAÇÃO.⁴

A primeira mutação associada ao gene *VHL* reconhecida como causadora de eritrocitose secundária congénita ligada às vias de sensibilização de oxigénio foi a Policitémia de Chuvash, uma doença autossómica recessiva, provocada pela mutação C598T, em que há níveis aumentados de Hb e de EPO em condições de normóxia. Teve este nome, porque, apesar de ser rara a nível mundial, foi considerada endémica na zona de Chuvashia na Rússia. Os doentes com esta patologia têm valores de HIF-1 α intracelular aumentados, em condições de normóxia, o que explica o aumento dos valores de EPO e conseqüente aumento de Hb.¹²

Posteriormente, foram identificadas outras mutações do gene *VHL*, em homozigotia ou em heterozigotia composta, promotoras de eritrocitose: C235T; G311T; G388C; G376T; A523G; C562G e C571G. A doença provocada por uma mutação no gene *VHL* e causadora de eritrocitose foi, então, renomeada eritrocitose congénita tipo 2 (ECYT2).⁷

Importante referir que existe, ainda, a síndrome de predisposição tumoral associado ao *VHL*, de transmissão autossómica dominante, causado por uma mutação na linha germinativa do *VHL*. Este síndrome está associado ao desenvolvimento de feocromocitoma, cancro de células claras do rim, hemangioblastomas do sistema nervoso central ou da retina, adenocarcinomas de baixo grau do osso temporal, cistoadenomas epididimários e doenças poliquísticas em múltiplos órgãos. Apesar de ser também uma doença causada por uma mutação no gene *VHL*, raramente está associada a eritrocitose.¹³⁻¹⁵

Mutação PHD2 – Congenital erythrocytosis type 3 (ECYT 3)

A degradação do HIF pelo proteasoma depende da hidroxilação de resíduos específicos de prolina existentes no seu domínio de degradação dependente de oxigénio e é mediada pela prolil-hidroxilase (PHD). Em condições de hipoxia a hidroxilação é inibida, pois precisa de oxigénio para que ocorra a ligação do PHD2, o que provoca uma estabilização do HIF α e a sua progressão na cascata de regulação das vias de sensibilidade de oxigénio.¹⁶

Na eritrocitose congénita tipo 3 (ECYT3) há uma mutação causadora de perda de função no gene Egl nine homolog 1 (*EGLN1*), de transmissão autossómica dominante.⁷ Até

hoje foram descritas três mutações causadoras de perda de função: Pro317Arg; Arg371His; G1112A. A mutação Pro317Arg e a mutação Arg371His alteram um resíduo que está na proximidade da região de ligação da proteína HIF-2 α . Por sua vez, a mutação G1112A no exão 3 do PHD2 fica a três posições da porção quelante de ferro His374, tornando a ligação ao HIF-2 α (resíduo primário do recetor prolil-hidroxilase) mais fraca e diminuindo a capacidade de ligação ao HIF-1 α (local de hidroxilação primário).^{6,17}

Conclui-se, assim, que as mutações no gene EGLN1 diminuem a capacidade de ligação do PHD2 ao HIF, uma vez que ocorrem em zonas quelantes do ferro, perto do local onde esta ligação ocorre. Quando o PHD2 não se liga ao HIF, este não é hidroxilado e, posteriormente, degradado. Esta inativação do PHD2 faz com que o HIF permaneça ativo, mesmo em condições de normóxia.¹⁶

Mutação HIF – congenital erythrocytosis type 4 (ECYT 4)

O HIF está associado à regulação da produção de EPO em situações de hipoxia, promovendo o aumento na massa eritrócitária e uma melhor oxigenação dos tecidos. Os HIF's são fatores de transcrição, constituídos por dímeros de subunidades α , induzíveis pela hipoxia (HIF-1 α ; HIF-2 α e HIF-3 α), e por uma sub-unidade constitutiva β ¹¹. Na presença de oxigénio, as subunidades α são hidroxiladas pelas proteínas PHD, o que lhes permite a interação com a proteína VHL e a sua consequente ubiquitinação e rápida degradação no proteasoma. Em condições de hipóxia, a hidroxilação da subunidade α não ocorre, uma vez que a proteína PHD necessita de oxigénio para promover a reação. Quando não está hidroxilada, a unidade α heterodimeriza-se com a unidade β e estabiliza. Esta proteína é transferida para o interior do núcleo celular e liga-se aos genes de fatores de resposta à hipoxia (HRE). O HIF contribui para a ativação da eritropoiese, ao regular o gene de produção da EPO, para a ativação da angiogénese e consequente aumento da vasculatura em zonas de isquémia, para o aumento da neoglicogénese, uptake de glicose celular e consequente aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP) por mecanismos anaeróbicos e para a diminuição da fosforilação oxidativa.¹⁸

As mutações do HIF que levam a eritrocitose são, habitualmente, mutações missense, de transmissão autossómica dominante, em que há ganho de função, ao contrário de todas as outras mutações promotoras de eritrocitose congénita secundária e ocorrem no exão 12, perto do local de hidroxilação da subunidade α , no terminal-C da mesma.

Esta alteração faz com que a proteína PHD2 não tenha local de ligação, levando a que o HIF não seja hidroxilado e, conseqüentemente, não seja degradado. Assim, na presença ou não de oxigênio, a subunidade α liga-se à subunidade β , a proteína HIF torna-se estável e mantém uma constante ativação dos mecanismos de resposta à hipoxia, entre eles a produção de EPO e conseqüente eritropoiese.¹⁹⁻²¹ São cinco as mutações conhecidas e associadas à eritrocitose congênita tipo 4 (ECYT4), causada por uma alteração no HIF-2 α : A1603G/M535V, G1605A/M535I; G1609A/G537R; G1609T/G537Y e C1617G/D539Q⁷.

As mutações no HIF podem, ainda, ser associadas a alterações na regulação de outros genes relacionados com a eritropoiese, nomeadamente em genes reguladores do VHL. Sabe-se também que, em situações de ganho de função do HIF, há um aumento na expressão do fator de transcrição relacionado com o Runt-related transcription factor 1 (RUNX1), o principal regulador da hematopoiese dos mamíferos, e do fator de transcrição nuclear eritroide 2 (NF-E2), essencial para a regulação da maturação megacariocítica e eritrocitária e para a expressão dos genes globínicos. O ganho de função encontrado no RUNX1 e NF-E2 na ECYT4 é responsável pelo aumento da eritropoiese independente da via de regulação da EPO.^{22,23} Há, por isso, dois mecanismos promotores de eritropoiese aumentados na ECYT4.²¹

Importante referir que as proteínas HIF controlam funções vitais, por exercerem influência em muitas vias de regulação e conjuntos de genes. O seu aumento é, por exemplo, responsável pelo efeito de Warburg – em que as células tumorais, mesmo em condições aeróbicas, continuam a dar preferência a metabolismos anaeróbicos.²⁴ O aumento da função do HIF está, ainda, associado à predisposição para tumores associados ao síndrome VHL e ao desenvolvimento de paraganglioma e de feocromocitoma.^{25,26}

Aumento da afinidade de O₂

Hemoglobinas de alta afinidade

O primeiro defeito molecular associado à eritrocitose congênita foi descrito em 1996, num caso de eritrocitose num homem de 81 anos, com um desvio da curva de dissociação de oxigênio para a esquerda (baixo p50). Neste caso, foi identificada uma alteração da cadeia α da hemoglobina a que se chamou Hb Chesapeake. Desde então, foram descritas mais de cem variantes de Hb em que há uma elevada afinidade para o oxigênio.¹

A grande maioria das alterações genéticas promotoras de Hb de alta afinidade são de transmissão autossômica dominante ou mutações de novo. As hemoglobinas de alta afinidade envolvem a β -globina (HBB), α 1-globina (HBA1) e α 2-globina (HBA2), sendo a primeira o mais prevalente.²⁷

As hemoglobinas de alta afinidade surgem principalmente por três mecanismos: mutações que dificultam a alteração entre os dois estados da Hb, o estado R e o estado T²⁸; uma mutação no local de ligação do 2,3-bifosfoglicerato(2,3BPG);²⁷ mutações no *heme pocket* (por exemplo a Hb Heathrow e a Hb Saint Nazaire).²⁹ Os mecanismos que mais comumente estão na etiologia das hemoglobinas de alta afinidade são a estabilização da mesma no estado R e as mutações no local de ligação de 2,3-BPG.²⁸

No estado R, a Hb tem uma maior afinidade pelo oxigênio, pois está num estado relaxado, enquanto no estado T há uma maior libertação do oxigênio para os tecidos, pois a Hb está num estado tenso. O estado R e T da hemoglobina são mediados pelas ligações α 1 β 2, logo as mutações promotoras de alta afinidade alteram muitas vezes esta interface, é exemplo disso a Hb Kempsey, em que há uma alteração na formação da ponte de hidrogênio, que normalmente estabiliza a forma desoxigenada de baixa afinidade do estado-T²⁷. Estas alterações promovem a difícil libertação de oxigênio para os tecidos periféricos, mantendo-se a hemoglobina no estado-R oxigenado mais estável. A terminação-C (terminação carboxil), das cadeias de globina, também está envolvida na estabilização das interações α 1 β 2 e no bom funcionamento da reação de Bohr (o oxigênio tem maior afinidade para a Hb quando há uma diminuição do catião hidrogênio no sangue, com aumento do pH ou, por outro lado, facilita a sua dissociação quando ocorre o oposto), estando já descritas numerosas mutações que alteram esta região e levam à formação de hemoglobinas de alta afinidade – como a Hb Hiroshima.³⁰ Quando há alteração no local de ligação de 2,3-BPG, este não se liga à Hb, não promovendo a libertação do oxigênio para os tecidos periféricos, como se verifica na Hb Rahere ou na Hb Providence ou na Hb Helsinki.²⁷

Diminuição da atividade da bifosfoglicerato mutase

Estão descritos na literatura três casos em que a eritrocitose congénita secundária pode ser associada a uma mutação missense do gene bifosfoglicerato mutase (BPGM), com diminuição do 2,3-BPG circulante e desvio do p50 para a esquerda.

O 2,3-BPG é uma importante proteína na regulação da afinidade do oxigênio para a Hb e é produzida durante a glicólise. Quando o 2,3 BPG se liga à Hb, no terminal-C, diminui a sua afinidade para com o oxigênio, permitindo uma eficiente oxigenação dos tecidos.

A BPGM é a enzima reguladora da produção de 2,3-BPG durante a glicólise. Um déficit desta enzima provoca uma diminuição da produção de 2,3-BPG, com um consequente aumento da afinidade da Hb para o oxigénio, desvio da curva p50 para a esquerda e desoxigenação tecidual. O aumento da produção eritroide ocorre de forma reativa, para compensar a hipoxia tecidual.³¹

Clínica

A heterogeneidade fenotípica dos doentes com eritrocitose congénita está largamente descrita na literatura, podendo ir desde assintomáticos, até manifestações tromboembólicas como fenómeno inaugural³². Nas situações de transmissão dominante, como nas ECTY1, ECTY3, ECTY4 e hemoglobinas de alta afinidade, a história familiar compatível com o quadro é característica, estando descritas algumas mutações de novo, e podendo esta heterogeneidade sintomática manifestar-se mesmo dentro de uma mesma família.³

Caracteristicamente, as eritrocitose apresentam sintomas de hiperviscosidade, geralmente moderados, como cefaleias, fadiga, parestesias, alterações visuais, vertigens e hipertensão arterial⁹. Porém, situações graves e com potencial risco de vida, como enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral ou fenómenos tromboembólicos periféricos, podem ocorrer tanto como fenómeno inaugural, como complicação tardia da doença.³³ Situações de doença cardiovascular prematura, com necessidade de intervenção médica ou cirúrgica estão, também, descritas. Hepatoesplenomegália, bem como causas secundárias de eritrocitose (doença cardíaca, pulmonar ou renal), não são encontradas nestes doentes.

A ECTY1, para além dos sintomas de hiperviscosidade, apresenta-se, geralmente, apenas alterações analíticas caracterizadas por aumento isolado do hematócrito, um aumento dos valores de Hb acima dos valores de referência e um aumento da massa eritrocitária, acompanhado de uma diminuição dos valores de EPO. Nesta entidade não há, caracteristicamente, organomegalias.⁹ Como doença autossómica dominante, na ECTY1 encontra-se, geralmente, uma história familiar compatível com eritrocitose.^{9,34,35}

A ECTY2 é uma patologia de transmissão autossómica recessiva. Para além dos sintomas de hiperviscosidade, associa-se a um maior risco tromboembólico, hemorrágico e de hipertensão pulmonar e, por isso, a uma maior mortalidade.^{12,14} É também caracterizada por alterações analíticas de eritrocitose, acompanhadas de valores elevados ou inapropriadamente normais de EPO para o Htc.¹⁰ Quando detetada na infância e adolescência, observa-se um atraso no crescimento, com percentis <5 para altura e peso tabelados para a idade.³⁶

ECTY3 é uma patologia de transmissão autossómica dominante, sendo frequente encontrar uma história familiar compatível com eritrocitose nestes doentes.⁷ Para além dos sintomas de hiperviscosidade, a eritrocitose e os normais ou ligeiramente elevados níveis de EPO, não é frequente estes doentes terem outras manifestações clínicas,

sendo muitas vezes diagnosticada apenas na idade adulta. É uma entidade raramente associada a eventos tromboembólicos.^{37,38}

ECTY4 é de transmissão autossômica dominante e, por isso, associada muitas vezes a história familiar compatível com eritrocitose.⁷ Como na ECTY2, esta patologia está muitas vezes associada a elevada viscosidade, com consequentes eventos tromboembólicos e uma mortalidade superior ao expectável. Estão descritos múltiplos casos de associação da ECTY4 com paraganglioma e feocromocitoma, o síndrome eritrocitose-paraganglioma.^{25,26,39} Para além disso, a mutação HIF2 α pode ser associada ao aparecimento de feocromocitomas e paragangliomas, mesmo na ausência de eritrocitose.⁴⁰

A eritrocitose provocada por um aumento da afinidade da hemoglobina para o oxigénio é maioritariamente provocada por mutações de transmissão autossômica dominante e ocorre como resposta a uma hipoxia tecidual.⁴¹ Sendo assim, estes doentes estão frequentemente assintomáticos, pois este é o seu estado hemodinamicamente estável.⁴² Para além disso, quando avaliados, para além de possíveis queixas de hiperviscosidade, podem ter diminuição da saturação periférica e têm um desvio da curva p50 para esquerda.²⁹

Diagnóstico

Tendo em conta a variabilidade de manifestações clínicas e da severidade das várias eritrocitoses, é possível inferir que a alteração do Htc inicial possa ser detetada nos cuidados de saúde primários, em análises de rotina ou usados como método de diagnóstico para outra patologia. Sendo assim, é lógico incluir os médicos de saúde geral e familiar num algoritmo de decisão, com o intuito de excluir causas de eritrocitose secundária e de encaminhar para as consultas de especialidade todas as eritrocitoses não explicadas. Desta forma, mais eritrocitoses serão estudadas, mesmo quando não são sintomáticas ou quando não motivam a ida a um serviço de urgência, permitindo uma melhor perceção das múltiplas etiologias e uma melhor compreensão da variabilidade da doença.

Quando identificada uma alteração no Htc pela primeira vez, ou seja, $Htc \geq 52\%$ nos homens e $\geq 45\%$ nas mulheres, o hemograma dever ser repetido em nova colheita para confirmar o resultado.³² Estamos perante uma eritrocitose real quando o aumento da massa eritrocitária é $\geq 25\%$ do valor expectável para o sexo e idade. Quando a última condição não se verifica, estamos perante uma pseudo-eritrocitose. Há estudos que comprovam que perante um $Htc \geq 60\%$ nos homens e $\geq 56\%$ em mulheres é seguro considerar que estamos perante uma eritrocitose real, sem avaliar a massa eritrocitária.⁴³

Perante este resultado, numa primeira abordagem, uma história clínica cuidada deve ser realizada, em que se procuram potenciais causas para eritrocitose secundária adquirida, a mais frequente de todas, e uma história familiar compatível com eritrocitose congénita. É, assim, necessário excluir todas as causas de eritrocitose secundária adquirida,⁴⁴ com a avaliação da função cardíaca e renal, da saturação de oxigénio periférico, para excluir causas de hipoxia tecidual, como o tabagismo e a Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono, uma ecografia abdominal e renal para excluir tumores produtores de EPO, como pode ser o carcinoma hepatocelular, o tumor de células renais e o feocromocitoma e avaliação do cálcio sérico, para excluir adenoma ou carcinoma paratiroide.⁴³ Há outros tumores produtores de EPO, como os hemangioblastomas cerebelares, os leiomiomas uterinos e os meningiomas, mas a sua prevalência é muito mais baixa na população e em que a eritrocitose não é a primeira manifestação, devendo ser excluídos apenas quando existe um elevado grau de suspeita.⁴³ Doentes transplantados renais ou em tratamento com androgénios também podem desenvolver eritrocitose secundárias adquiridas.³² Excluídas ou corrigidas estas situações, o Htc deve ser re-avaliado, para que se considere uma situação persistente. Perante uma

eritrocitose persistente o próximo passo na avaliação do doente será a avaliação dos valores de EPO sérica e o encaminhamento para consulta na especialidade de hematologia, se o estudo tiver sido iniciado nos cuidados de saúde primários.

Se os valores de EPO forem inferiores aos valores normais (4.1-19.5 mU/mL em adultos, de acordo com a Organização Mundial de Saúde), estamos perante uma eritrocitose primária. A principal causa de eritrocitose primária é a Policitemia Vera (PV), provocada na maior parte dos casos por uma mutação adquirida no exão 14 do JAK2, a mutação KAK2 V917F. Porém, em situações de história familiar compatível com eritrocitose é legítimo iniciar o estudo pelo screening de mutações causadoras de ECYT1.

O diagnóstico de PV devendo inicia-se com o screening da mutação JAK2 V617F no sangue periférico, presente em 95% dos casos. O screening para pesquisa de alterações no exão 12, identifica quase na totalidade os restantes casos. Doentes com mutações no exão 12 são, tendencialmente, mais jovens, com concentrações mais elevadas de Hb e menor variação nos valores leucocitários e trombóticos, com biópsia medular em que há um aumento muito marcado da eritropoiese, com granulócitos e megacariócitos normais ou pouco alterados. Quando nenhuma das alterações é identificada no sangue periférico a biópsia medular deve ser realizada. Histologicamente, na biópsia medular de um doente com PV encontramos um aumento da eritropoiese, da granulopoiese e da megacariocitopoiese, megacariócitos de tamanhos muito variados, com núcleos grandes e hiperlobados, que se dispõem em aglomerados, uma maturação granulocítica desorganizada, uma eritropoiese eritrobástica e uma ausência das reservas de ferro. Após a realização dos exames devem ser aplicados os critérios para uma PV JAK2 negativa, presentes na Tabela 2, para confirmar ou excluir o diagnóstico.⁴³

TABELA 2 - CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE POLICITÊMIA VERA⁴³

Crítérios de diagnóstico de Policitemia Vera
<p>JAK2 positiva (2 de 2)</p> <p>Hmt elevado (52% nos homens e 48% nas mulheres) OU aumento da massa eritrocitária 25% acima dos valores de referência</p> <p>Mutação no gene JAK2</p>
<p>JAK2 negativa (4 critérios A + 1 critério B ou 2 critérios C)</p> <p>Crítérios A</p> <p>Hmt elevado (60% nos homens e 56% nas mulheres) OU aumento da massa eritrocitária 25% acima dos valores de referência</p> <p>Ausência de mutação JAK2</p>

Sem causa de eritrocitose secundária adquirida identificada

Avaliação histológica da medula óssea compatível com PV

Critérios B

Esplenomegália palpável

Identificação de alteração genética adquirida na célula hematopoiética EXCETO mutação BCR-ABL1

Critérios C

Trombocitose $> 450 \times 10^9/L$

Leucocitose com neutrofilia $> 10 \times 10^9/L$ em não fumadores e $> 12,5 \times 10^9/L$ em fumadores

Evidências imagiológicas de esplenomegália

EPO sérica diminuída

O diagnóstico de ECTY1 é feito quando são identificadas mutações no exão 8 e no exão 7 do EPOR, específicas do seu domínio citoplasmático.² Quando este screening para ECTY1 e para PV é negativo, a mutação no gene LNK deve ser pesquisada.⁴⁵

Se os valores de EPO estiverem normais ou aumentados, excluindo uma causa secundária adquirida solucionável ou que necessite de cuidados específicos por parte de uma especialidade diferente da hematologia, a avaliação da curva p50 de afinidade de oxigénio e a procura de uma história familiar compatível com eritrocitose secundária congénita são o próximo passo a seguir quase de forma simultânea⁴. Sendo neste ponto que, nos cuidados de saúde primária, o doente deve ser referenciado para seguimento específico em hematologia.

Quando o valor de p50 é $< 22,6$ mmHg, estamos perante um aumento da afinidade do oxigénio para a hemoglobina, com conseqüente hipoxia tecidual periférica e, portanto, uma eritrocitose secundária reativa a este fator.⁴⁶ Sendo as hemoglobinas de alta afinidade a principal causa de eritrocitose secundária congénita por aumento da afinidade do oxigénio à hemoglobina, estas devem ser as primeiras a ser pesquisadas.^{27,41} Quando o estudo molecular de HBB e HBA é negativo, devemos avançar para a pesquisa de mutações na BPGM com diminuição da 2,3 BPG.³¹

Por outro lado, quando o P50 $> 22,6$ mmHg exclui-se um aumento da afinidade da Hb para o oxigénio, sendo mais provável estarmos perante uma eritrocitose secundária conseqüente a uma alteração nas vias de sensibilidade ao oxigénio. Neste campo temos mutações de transmissão autossómica dominante, como a no PHD2 e no HIF, que terão uma história familiar para eritrocitose positiva e mutações de transmissão autossómica recessiva, como é a mutação causadora de eritrocitose no VHL, que devem ser pesquisadas em função dessa mesma história.⁷

Tendo em conta a quantidade de mutações de novo descritas na literatura e mesmo o desconhecimento populacional e o subdiagnóstico destas entidades, parece conveniente, quando não identificada a etiologia da eritrocitose, fazer um screening em massa de todas as mutações potenciais descritas, como proposto no algoritmo da figura IV. 3,5,6,32

Se todas forem negativas, é legítimo determinar que a eritrocitose é idiopática. 3,5,32,47

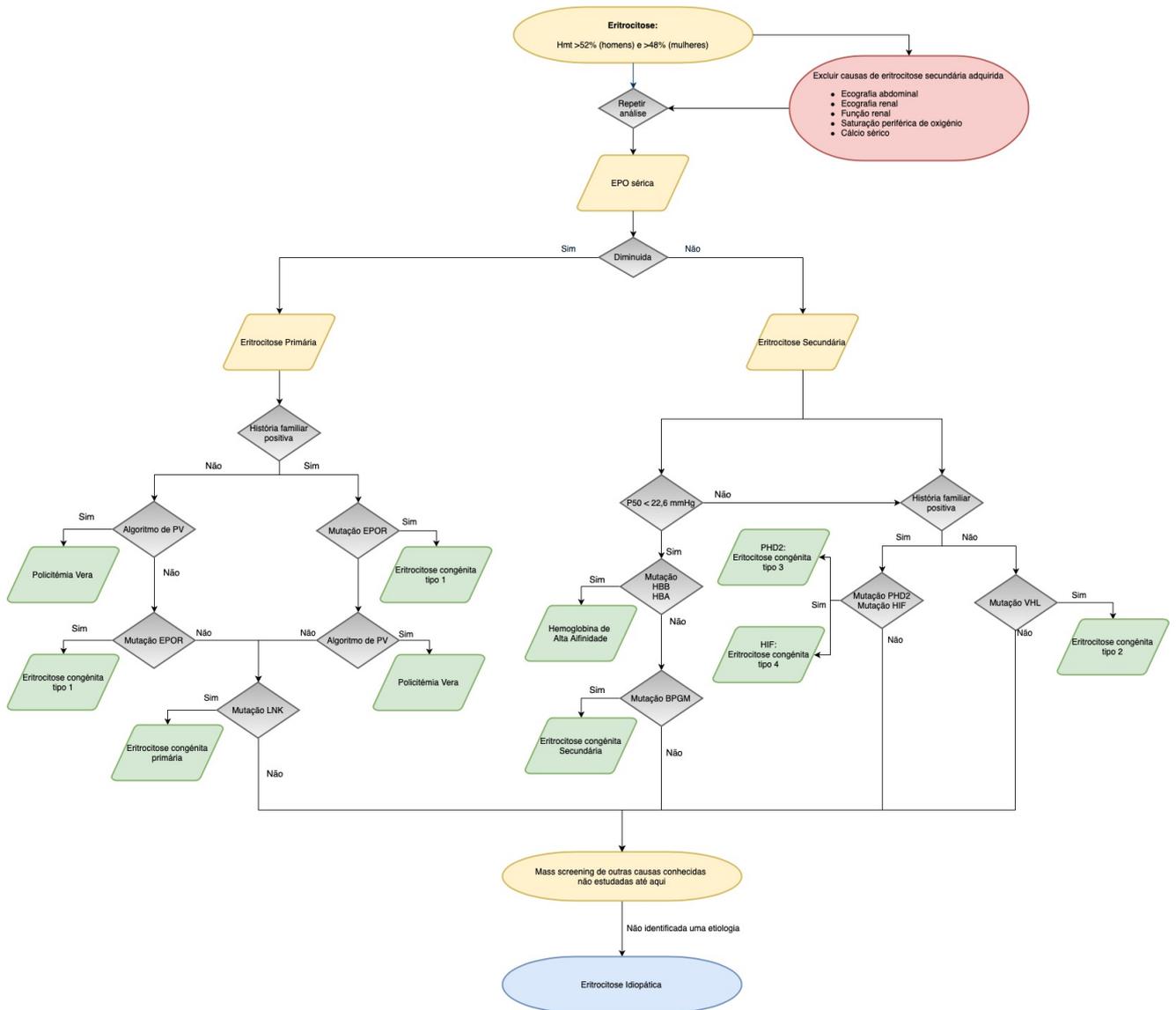


FIGURA IV - ALGORITMO DIAGNÓSTICO NA ERITROCITOSE

Tratamento

A Flebotomia pode ser útil no alívio sintomático da eritrocitose, geralmente com a intenção de manter o Hct < 45% quando há manifestações de hiperviscosidade, de forma regular ou esporádica.⁴⁸ Por ação direta, pode reduzir a contagem de eritrócitos em aproximadamente 10%. Para além disso, reduz os valores séricos de ferro, causando uma diminuição no volume corpuscular médio, contribuindo para uma diminuição significativa no Hct.³²

Há evidência da melhoria dos sintomas e dos valores analíticos da eritrocitose, na ECVT1, em mulheres pós-puberdade e pré-menopausa, o que permite inferir que a hemorragia mensal causada pela menstruação pode ser o suficiente para a melhoria clínica em doentes do sexo feminino, durante o seu período fértil, não havendo necessidade de recorrer à flebotomia.³⁵

Quando há aumento da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, os doentes apresentam-se frequentemente assintomáticos, uma vez que a sua eritrocitose é reativa a esse aumento de afinidade causador de hipoxia. Nestes casos, as flebotomias podem vir alterar o estado hemodinamicamente estável do doente e causar sintomas como astenia, fadiga ou dispneia, pela diminuição dos oxigénio disponível para os tecidos, não sendo de todo viável tentar manter valores de Hct < 0,45. Nestes casos, o valor que se procura alcançar é de Hct < 0,60, podendo este limiar ser reduzido para Hct < 0,52 quando há evidência de eventos tromboembólicos ou sinais claros de hiperviscosidade. É ainda indicação para flebotomia, em indivíduos assintomáticos, a existência de um familiar com a mesma patologia e que tenha tido um evento tromboembólico com os mesmos valores de Hct.⁴⁵

O uso de antiagregantes, como o ácido acetilsalicílico, tem tido resultados divergentes na literatura, no entanto, o seu uso em baixas doses pode diminuir a função plaquetar e consequentemente diminuir os eventos tromboembólicos.^{32,47}

É importante, em doente com manifestações agressivas da sua eritrocitose, como hipertensão arterial pulmonar, mais comum em situações de eritrocitose congénitas secundárias, como a ECVT 2 e ECVT4, sejam tomadas medidas de tratamento dirigido para minimização das consequências a longo prazo.^{33,49}

Infelizmente, a maioria das conclusões sobre o tratamento e gestão de um doente com eritrocitose congénita são extrapoladas de estudos realizados em doentes com Policitemia Vera. Espera-se que, com uma maior identificação da etiologia das

eritrocitose, sejam feitos estudos dirigidos que permitam conclusões mais precisas sobre o tratamento destes doentes.¹⁷

A eficácia de inibidores da JAK2 já está comprovada no tratamento de neoplasias mieloproliferativas. Assim, o estudo da sua utilidade no tratamento de eritrocitoses congénitas primárias ou derivadas de alterações na via de sensibilidade ao oxigénio, pode ser próximo passo para o melhor tratamento destas doenças.^{8,32}

Conclusão

As eritrocitoses são entidades raras, cuja etiologia fica muitas vezes por esclarecer, porém, com o melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos e moleculares da regulação da eritropoiese e de oxigenação dos tecidos foi possível estabelecer um algoritmo de diagnóstico que permite uma melhor compreensão destas entidades nosológicas.

As eritrocitoses congénitas são mais raras que as adquiridas. Dentro das adquiridas a probabilidade de encontrar uma causa secundária que esteja a provocar o aumento do Htc, é superior à de encontrar uma PV.⁴⁷ Perante uma história familiar positiva, a suspeita de uma eritrocitose congénita tem mais relevo, uma vez que é sustentada por um diagnóstico prévio. Sendo assim, é por esta ordem que devem ser pesquisadas as etiologias. Excluídas as causas de eritrocitose secundária e perante uma diminuição dos valores de EPO com história familiar negativa, deve ser pesquisado a PV. Perante uma história familiar positiva, de acordo com os valores de EPO a pesquisa deve ser iniciada pelas eritrocitoses congénitas autossómicas dominantes.

Atualmente, sabe-se que a ECTY1 é de transmissão autossómica dominante e associada a mutações no EPOR, que fazem com que este não seja desativado após se ligar à EPO. Já a ECTY2, de transmissão autossómica recessiva, é associada a mutações no gene VHL, responsável pela degradação final da proteína HIF, impedindo a sua progressão na cascata de ativação de resposta à hipoxia. A ECTY3 é de transmissão autossómica dominante e ocorre quando há uma mutação na proteína PHD2 que impede a ligação da mesma ao HIF na presença de oxigénio, não o sinalizando para que sofra a ação de ubiquitinação provocada pelo VHL. Por fim, a ECTY4 é de transmissão autossómica dominante e é provocada por uma alteração no local de ligação do HIF ao PHD2, o que faz com que o HIF não seja degradado. As hemoglobinas de elevada afinidade ou as alterações causadoras de estados de elevada afinidade da hemoglobina para o oxigénio, como são as mutações no 2,3BPGM, provocam um estado de eritrocitose reativa ao estado de hipóxia tecidual, causado pela dificuldade que existe para que a hemoglobina liberte o oxigénio. Apesar destes conhecimentos, ainda existe uma elevada percentagem de casos em que a etiologia da eritrocitose fica por determinar.

Estudos randomizados e de coorte em doentes diagnosticados com eritrocitose idiopática, em que é feita uma sequenciação massiva de genes potenciais, permitiram a clarificação da etiologia em alguns dos casos e a identificação de novas mutações^{2,3,5}.

Sendo assim, um screening em massa de genes causadores de eritrocitose ou de aparente interesse, como o VHL, EPAS1, EGLN1, HIF1 α , HIF3 α , EGLN2, EGLN3, EPOR, JAK2, HBB, HBA1, HBA2 ou BPGM, ⁵ quando perante uma eritrocitose idiopática, pode ser um caminho produtivo no esclarecimento de mais etiologias e de diagnósticos mais completos.

Dado a sua raridade e tendo em conta a dificuldade em esclarecer a etiologia da eritrocitose, exceto na PV ou nas causas secundárias adquiridas, ainda não há tratamentos dirigidos para a eritrocitose. O alívio sintomático e a tentativa de minorar consequências a longo prazo, principalmente na ECYT2 e na ECYT4, que parecem ser mais agressivas que as restantes, é tudo o que há para oferecer aos doentes. Estudos futuros, com inibidores da proteína HIF ou análogos das proteínas PHD2 ou VHL para as causas secundárias, ou da proteína JAK2 no caso da ECYT1, parecem ser o próximo passo a tomar na procura de terapêuticas mais dirigidas.

O estudo clínico do genoma, ou seja, a adequação das terapêuticas ao encontrado num mapeamento do genoma, pode provar-se útil nestes doentes. Esta técnica permite a aplicação de terapêuticas mais dirigidas ou o estudo de novas terapêuticas. Para além disso, pode também ser usada de forma preventiva para complicações da patologia, permitindo a sua monitorização ou mesmo uma intervenção profilática antes de haverem consequências nefastas para o doente, em função das alterações encontradas no genoma e à luz do que se preveja que possa vir a acontecer.

Bibliografia

1. Patnaik MM, Tefferi A. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. *Leukemia*. 2009;23(5):834-844. doi:10.1038/leu.2009.54.
2. Bento C, Almeida H, Maia TM, et al. Molecular study of congenital erythrocytosis in 70 unrelated patients revealed a potential causal mutation in less than half of the cases (Where is/are the missing gene(s)?). *Eur J Haematol*. August 2013;n/a-n/a. doi:10.1111/ejh.12170.
3. Randi ML, Bertozzi I, Cosi E, Santarossa C, Peroni E, Fabris F. Idiopathic erythrocytosis: a study of a large cohort with a long follow-up. *Ann Hematol*. 2016;95(2):233-237. doi:10.1007/s00277-015-2548-z.
4. Bento C. Genetic basis of congenital erythrocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2018;40:62-67. doi:10.1111/ijlh.12828.
5. Camps C, Petousi N, Bento C, et al. Gene panel sequencing improves the diagnostic work-up of patients with idiopathic erythrocytosis and identifies new mutations. *Haematologica*. 2016;101(11). doi:10.3324/haematol.2016.144063.
6. Bento C, Percy MJ, Gardie B, et al. Genetic Basis of Congenital Erythrocytosis: Mutation Update and Online Databases. *Hum Mutat*. 2014;35(1):15-26. doi:10.1002/humu.22448.
7. Hussein K, Percy M, McMullin MF. Clinical utility gene card for: familial erythrocytosis. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(5):4-4. doi:10.1038/ejhg.2011.252.
8. Huang LJ, Shen Y-M, Bulut GB. Advances in understanding the pathogenesis of primary familial and congenital polycythaemia. *Br J Haematol*. 2010;148(6):844-852. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08069.x.
9. Aljabry M. Primary familial and congenital polycythemia; The forgotten entity. *J Appl Hematol*. 2018;9(2):39. doi:10.4103/joah.joah_30_18.
10. Cells RED, Lanikova L, Lorenzo F, et al. Novel homozygous VHL mutation in exon 2 is associated with congenital polycythemia but not with cancer. 2016;121(19):3918-3925. doi:10.1182/blood-2012-11-469296.causing.
11. Percy MJ, Lee FS. Familial erythrocytosis: Molecular links to red blood cell control. *Haematologica*. 2008;93(7):963-967. doi:10.3324/haematol.13250.
12. Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, et al. Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. 2016;103(10):3924-3933. doi:10.1182/blood-2003-07-2535.Supported.
13. Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E, et al. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat*. 2010;n/a-n/a. doi:10.1002/humu.21219.
14. Bartels M, van der Zalm MM, van Oirschot BA, et al. Novel Homozygous Mutation of the Internal Translation Initiation Start Site of VHL is Exclusively Associated with Erythrocytosis: Indications for Distinct Functional Roles of von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Isoforms. *Hum Mutat*. 2015;36(11):1039-1042. doi:10.1002/humu.22846.
15. Richard S, Gardie B, Couvé S, Gad S. Von Hippel-Lindau: How a rare disease illuminates cancer biology. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(1):26-37. doi:10.1016/j.semcancer.2012.05.005.
16. Percy MJ, Furlow PW, Beer PA, Lappin TRJ, McMullin MF, Lee FS. A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove. 2016;110(6):2193-2197. doi:10.1182/blood-2007-04-084434.The.
17. Lee FS, Percy MJ. The HIF Pathway and Erythrocytosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6(1):165-192. doi:10.1146/annurev-

- pathol-011110-130321.
18. Sambasivarao S V. Genetic Causes of Erythrocytosis and the Oxygen Sensing Pathway. *Blood Rev.* 2013;18(9):1199-1216. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.
 19. Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, et al. A Gain-of-Function Mutation in the HIF2A Gene in Familial Erythrocytosis. 2008.
 20. van Wijk R, Wood M, Lee FS, et al. Novel exon 12 mutations in the HIF2A gene associated with erythrocytosis. *Blood.* 2008;111(11):5400-5402. doi:10.1182/blood-2008-02-137703.
 21. Perrotta S, Stiehl DP, Punzo F, et al. Congenital erythrocytosis associated with gain-of-function HIF2A gene mutations and erythropoietin levels in the normal range. *Haematologica.* 2013;98(10):1624-1632. doi:10.3324/haematol.2013.088369.
 22. Cells RED, Kapralova K, Lanikova L, et al. RUNX1 and NF-E2 upregulation is not specific for MPNs, but is seen in polycythemic disorders with augmented HIF signaling. 2016;123(3):391-395. doi:10.1182/blood-2013-10-534222.The.
 23. Hamadou WS, Bourdon V, Gaildrat P, et al. Mutational analysis of JAK2, CBL, RUNX1, and NPM1 genes in familial aggregation of hematological malignancies. *Ann Hematol.* 2016;95(7):1043-1050. doi:10.1007/s00277-016-2678-y.
 24. Wideman TH, Zautra AJ, Edwards RR. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. 2014;154(11):2262-2265. doi:10.1016/j.pain.2013.06.005.Re-Thinking.
 25. Taïeb D, Yang C, Delenne B, et al. First Report of Bilateral Pheochromocytoma in the Clinical Spectrum of HIF2A -Related Polycythemia-Paraganglioma Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):E908-E913. doi:10.1210/jc.2013-1217.
 26. Lorenzo FR, Yang C, Ng Tang Fui M, et al. A novel EPAS1/HIF2A germline mutation in a congenital polycythemia with paraganglioma. *J Mol Med.* 2013;91(4):507-512. doi:10.1007/s00109-012-0967-z.
 27. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(3). doi:10.1101/cshperspect.a011858.
 28. Hong W-J, Gotlib J. Hereditary erythrocytosis, thrombocytosis and neutrophilia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014;27(2):95-106. doi:10.1016/j.beha.2014.07.002.
 29. Shin SY, Kim HY, Kim HJ, Kim HG. Hb Heathrow [β 103(G5)Phe→Leu], a First Report in an Asian Patient with Erythrocytosis. *Yonsei Med J.* 2017;58(3):665-667. doi:10.3349/ymj.2017.58.3.665.
 30. Tamura S, Tamura T, Gima H, et al. A Japanese Family with Congenital Erythrocytosis Caused by Haemoglobin Bethesda. *Intern Med.* 2015;54(18):2389-2393. doi:10.2169/internalmedicine.54.4520.
 31. Price D. Erythrocytosis associated with a novel missense mutation in the BPGM gene. *Reg Anesth Pain Med.* 2012;37(6):676-677.
 32. McMullin MF. Diagnosis and management of congenital and idiopathic erythrocytosis. *Ther Adv Hematol.* 2012;3(6):391-398. doi:10.1177/2040620712458947.
 33. Sarangi S, Lanikova L, Kapralova K, et al. The homozygous VHL(D126N) missense mutation is associated with dramatically elevated erythropoietin levels, consequent polycythemia, and early onset severe pulmonary hypertension. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(11):2104-2106. doi:10.1002/pbc.25056.
 34. Rourke KO, Fairbairn DJ, Jackson KA, Morris KL, Kennedy STGA. A novel mutation of the erythropoietin receptor gene associated with primary familial and congenital polycythemia. 2011:542-544. doi:10.1007/s12185-011-0813-z.

35. Toriumi N, Kaneda M, Hatakeyama N, et al. A case of primary familial congenital polycythemia with a novel EPOR mutation: possible spontaneous remission/alleviation by menstrual bleeding. *Int J Hematol*. 2018;108(3):339-343. doi:10.1007/s12185-018-2435-1.
36. Tomasic NL, Piterkova L, Huff C, et al. The phenotype of polycythemia due to Croatian homozygous VHL (571C > G: H191D) mutation is different from that of Chuvash polycythemia (VHL 598C > T: R200W). 2013;98(4):560-567. doi:10.3324/haematol.2012.070508.
37. Préhu C, Wajcman H, Moradkhani K, Al-Sheikh M, Lopez M. Disturbance in the HIF-1 α pathway associated with erythrocytosis: Further evidences brought by frameshift and nonsense mutations in the prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) gene. *Blood Cells, Mol Dis*. 2007;40(2):160-165. doi:10.1016/j.bcmd.2007.07.017.
38. Albiero E, Ruggeri M, Fortuna S, et al. Isolated erythrocytosis: study of 67 patients and identification of three novel germ-line mutations in the prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) gene. 2012;2(1):123-127. doi:10.3324/haematol.2010.039545.
39. Buffet A, Smati S, Mansuy L, et al. Mosaicism in HIF2A -Related Polycythemia-Paraganglioma Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(2):E369-E373. doi:10.1210/jc.2013-2600.
40. Comino-Méndez I, de Cubas AA, Bernal C, et al. Tumoral EPAS1 (HIF2A) mutations explain sporadic pheochromocytoma and paraganglioma in the absence of erythrocytosis. *Hum Mol Genet*. 2013;22(11):2169-2176. doi:10.1093/hmg/ddt069.
41. Percy MJ, Butt NN, Crotty GM, et al. Identification of high oxygen affinity hemoglobin variants in the investigation of patients with erythrocytosis. 2009;36(5):9-10. doi:10.3324/haematol.2009.008037.
42. Ip KLR, So JC-C, Law M-F, Wong RSM, Tam HC, Ng MHL. Hb Tarrant [α 126(H9)Asp \rightarrow Asn; HBA2: c.379G > A (or HBA1)] in a Chinese Family as a Cause of Familial Erythrocytosis. *Hemoglobin*. 2016;40(4):260-263. doi:10.1080/03630269.2016.1177538.
43. McMullin MF, Harrison CN, Ali S, et al. A guideline for the diagnosis and management of polycythaemia vera. A British Society for Haematology Guideline. *Br J Haematol*. November 2018. doi:10.1111/bjh.15648.
44. Percy MJ, Rumi E. Genetic origins and clinical phenotype of familial and acquired erythrocytosis and thrombocytosis. *Am J Hematol*. 2009;84(1):46-54. doi:10.1002/ajh.21313.
45. McMullin MF. Investigation and Management of Erythrocytosis. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;11(5):342-347. doi:10.1007/s11899-016-0334-1.
46. Rumi E, Passamonti F, Pagano L, et al. Blood p50 evaluation enhances diagnostic definition of isolated erythrocytosis. 2008;2. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.02014.x.
47. McMullin MF. Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:629-635. doi:10.1182/asheducation-2009.1.629.
48. Bento C, Almeida H, Fernandez-Lago C, Ribeiro ML. Primary familial congenital erythrocytosis: two novel EPOR mutations found in Spain. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(5):e27-e28. doi:10.1111/ijlh.12061.
49. Al-Biltagi M, Ismail MF, Al-Radi OO, Baho H. A triple challenge: Thrombocytopenia in a 7-year-old girl with unrepaired d-transposition of the great arteries, ventricular septal defect, and pulmonary hypertension. *Pediatr Cardiol*. 2013;34(8):2021-2023. doi:10.1007/s00246-012-0570-7.

