



Faculdade de Medicina da Universidade Lisboa  
Clínica Universitária de Pediatria  
Diretora: Prof. Dra. Maria do Céu Machado



Trabalho final do Mestrado Integrado em Medicina

# **Terapêutica Imunossupressora na Anemia Aplásica: a propósito de um caso clínico**

Autor: Susana Damásio Alexandre

Orientador: Dra. Maria João Palaré

2015/2016

## **Resumo**

Na Anemia Aplásica Grave (AAG), o transplante alogénico de células hematopóéticas a partir de um dador relacionado com antigénio leucocitário humano compatível apresenta-se como o único tratamento potencialmente curativo e de sucesso demonstrado. Este é o procedimento de eleição em crianças com AAG, com dador compatível e sem comorbilidades significativas. Contudo, menos de um terço dos doentes são candidatos adequados ao transplante por ausência dos requisitos necessários. Assim, a terapêutica imunossupressora (TIS) surge como a solução mais comumente utilizada.

Esta revisão apresenta a história de uma criança diagnosticada com AAG que inicia TIS por inexistência de dador adequado. Foi instituída a TIS de primeira linha, que combina globulina anti-timócito de cavalo (GAT) e a ciclosporina, e acompanhada a sua evolução durante 12 meses. Esta terapêutica surte resposta em cerca de 70% dos doentes, no entanto, contrariamente ao expectável, o doente apresentou-se refratário. Nestas situações está preconizado um segundo curso de imunossupressão com GAT de coelho, mas os resultados não são satisfatórios pelo que serão abordadas terapêuticas, como o alemtuzumab, eltrombopag e androgéneos, que se têm demonstrado promissoras. Serão ainda discutidos agentes passíveis de aumentar a resposta à TIS de primeira linha, quando usados como alternativa ou adição a esta.

## **Abstract**

In Severe Aplastic Anemia (SAA), the allogeneic hematopoietic cell transplantation from a HLA-matched related donor is presented as the only potentially curative treatment with demonstrated success. This is the procedure of choice in children with SAA, with a compatible donor and without significant comorbidities. However, less than a third of the patients are suitable candidates for transplantation due to lack of the necessary requirements. Thus, the immunosuppressive therapy (IST) emerges as the most commonly used solution.

This review presents the history of a child diagnosed with SAA that starts IST due to the absence of a suitable donor. The IST first line is established, which combines antithymocyte globulin (ATG) from a horse and cyclosporine, and its evolution is followed for 12 months. This therapeutics causes response in approximately 70% of the patients, however, contrary to expectations, the patient presented himself refractory. In these situations, it is recommended a second course of immunosuppression with rabbit ATG, but the results are not satisfactory and therefore other therapies will be addressed, such as alemtuzumab, eltrombopag and androgens, which have shown promising results. Agents likely to increase the response to IST first line, will be discussed, when used as an alternative or addition to this.

## Índice

Resumo .....	2
Abstract .....	3
Índice de Acrónimos .....	5
Introdução .....	6
Caso Clínico .....	13
Discussão .....	17
Bibliografia .....	24

## **Índice de Acrónimos**

**AA** – Anemia Aplásica

**AAG** – Anemia Aplásica Grave

**ALH** – Antígeno Leucocitário Humano

**GAT** – Globulina Anti-timócitos

**GATc** – Globulina Anti-timócitos de coelho

**GATe** – Globulina Anti-timócitos equina

**CAA** – Células Apresentadoras de Antígeno

**CAL** – Contagem Absoluta de Linfócitos

**CAR** – Contagem Absoluta de Reticulócitos

**CE** – Concentrados Eritrocitário

**CEH** – Células Estaminais Hematopoiéticas

**CIBMTR** - *Center for International Blood and Marrow Transplant Research*

**CP** – Concentrado Plaquetário

**CPH** – Complexo Principal de Histocompatibilidade

**CsA** – Ciclosporina A

**Cy** – Ciclofosfamida

**DEB** – Sensibilidade ao Diepoxibutano

**DECH** – Doença do Enxerto contra Hospedeiro

**EBMT** – *European Society for Blood and Marrow Transplantation*

**EMC** – Iniciais do nome do nosso doente

**FEC-G** – Factor Estimulante de Colónias de Granulócitos

**Hb** – Hemoglobina

**MMF** – Micofenolato Mofetil

**N** – Número de doentes que participaram no estudo

**NIH** – *National Institutes of Health*

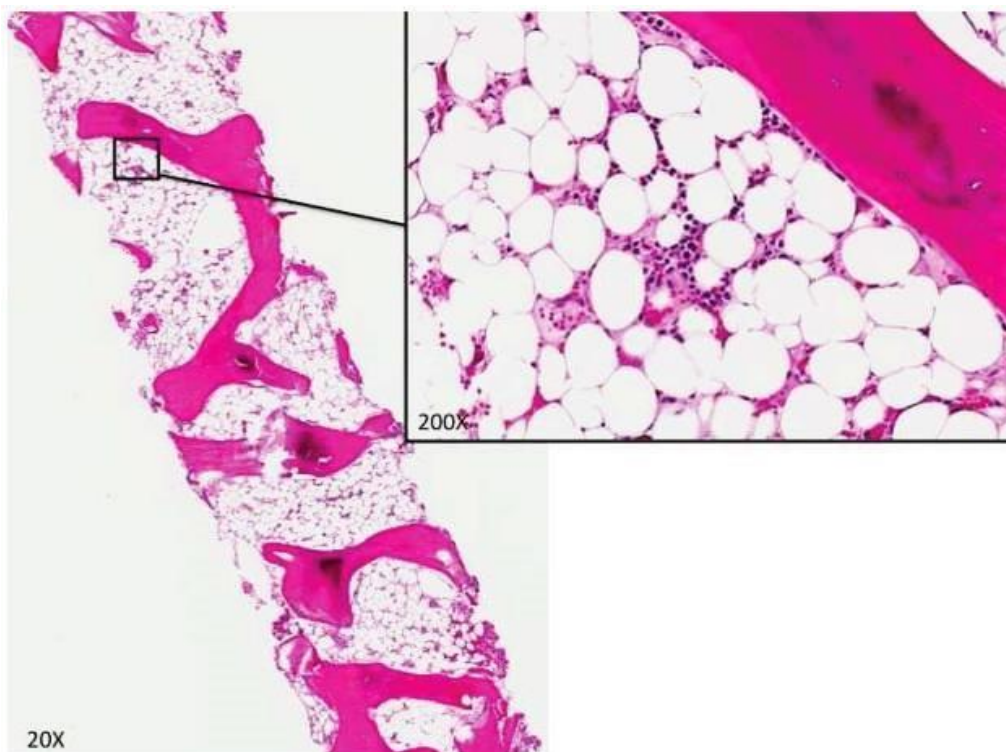
**TACH** – Transplante Alogénico de Células Hematopoéticas

**TIS** – Terapêutica Imunossupressora

**VGM** – Volume Globular Médio

## Introdução

A anemia aplásica é caracterizada por pancitopénia com insuficiência da medula óssea resultante da lesão grave do compartimento das células hematopoiéticas. Esta comporta-se como uma doença mediada imunologicamente, de que resulta uma medula óssea substituída por gordura observada em biopsia osteomedular (Figura 1) e na ressonância magnética da coluna vertebral.



**Figura 1:** Aspirado de medula óssea e biópsia de um paciente com AA adquirida. Os elementos hematopoiéticos estão muito reduzidos, e há zonas com substituição de medula por tecido adiposo. (H & E, aumento original x 20; H & E, aumento original x 200). (1)

A anemia aplásica pode ser classificada em três categorias, considerando as contagens de neutrófilos, plaquetas e reticulócitos (tabela 1).

**Tabela 1:** Definição da gravidade da anemia aplásica (Camitta et al, 1975; Bacigalupo et al 1988) (1)

<b>Moderado ou não-grave (AANG)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição da celularidade da medula óssea e citopenia no sangue periférico;</li> <li>+ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não cumpre critérios de AAG</li> </ul> </li> </ul>
<b>Grave (AAG)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Celularidade da medula óssea &lt;25%</li> <li>+ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pelo menos dois dos seguintes: <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Contagem de neutrófilos &lt;500 × 10<sup>6</sup>/L</li> <li>b) Contagem de plaquetas &lt;20.000 × 10<sup>6</sup>/L</li> <li>c) Contagem de reticulócitos<sup>1</sup> &lt;60.000 × 10<sup>6</sup>/L</li> </ol> </li> </ul> </li> </ul>
<b>Muito grave (AAMG)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preenche os critérios para AAG</li> <li>+ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contagem de neutrófilos &lt;200 × 10<sup>6</sup>/L</li> </ul> </li> </ul>

<sup>1</sup> Contagem de reticulócitos automatizado (ou contagens manuais de 20.000 × 10<sup>6</sup>/L)

Até à década de 1970, havia pouco a oferecer aos doentes com anemia aplásica grave, pelo que era quase uniformemente fatal. Porém, no início do século XXI, devido a avanços no transplante de células hematopoiéticas, nas terapêuticas biológicas e imunossupressoras e nos cuidados de suporte, a maioria dos doentes podem ser tratados eficazmente e esperar uma sobrevivência a longo prazo. (2)

Em doentes com idade inferior a 25 anos, numerosos estudos têm demonstrado que o transplante é a terapêutica de primeira linha (3) quando existe um irmão dador com ALH compatível, apresentando taxas de sobrevida de cerca de 80% atingidas em 5 anos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Transplante alogénico de irmão na Anemia Aplásica Grave (4, 5)

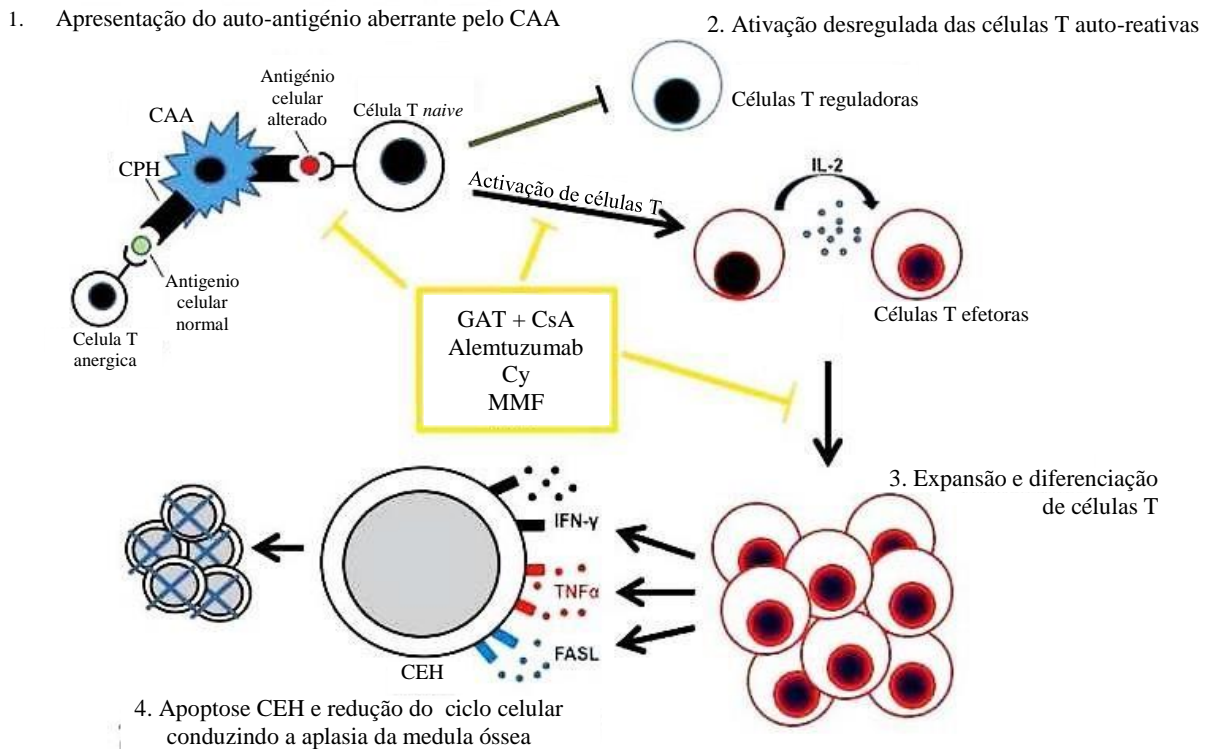
Instituição /Estudo	Duração Estudo	N	Idade em anos (média)	Rejeição excerto /insucesso	DECH agudo, %	DECH crónico, %	Sobrevivência %
<b>CIBMTR</b>	1988-1992	471	20 (1-51)	16	19	32	66 em 5anos
<b>Vienna</b>	1982-1996	20	25 (17-37)	0	26	53	95 em 15 anos
<b>EBMT</b>	1991-1998	71	19 (4-46)	3	30	35	86 em 5 anos
<b>Seoul</b>	1990-1999	22	22 (14-43)	5	10	33	95 em 5 anos
<b>Hamburg</b>	1990-2001	21	25 (7-43)	5	5	5	86 em 5anos
<b>Paris</b>	1994-2001	33	20 (8-42)	6	0	42	94 em 5 anos
<b>São Paulo</b>	1993-2001	81	24 (3-53)	22	37	39	56 em 6 anos
<b>Taipei</b>	1985-2001	79	22 (4-43)	8	7	35	74 em 5 anos
<b>Tunis</b>	1998-2001	31	19 (4-39)	16	11	3	86 em 2 anos
<b>London</b>	1989-2003	33	17 (4-46)	24	14	4	81 em 5 anos
<b>Mexico City</b>	2000-2005	23	25 (4-65)	26	17	26	88 em 4anos
<b>Japan</b>	1992-2009	213	11 (0-16)	4.7	12	6	92 em 10anos

De facto, o transplante cura a grande maioria dos doentes, contudo um irmão-dador compatível está disponível em apenas 20% a 30% dos casos, pelo que esta opção é inviável para a maioria dos doentes.(4) Neste contexto, surge a terapêutica imunossupressora, que produz recuperação hematológica em 60-70% dos casos e excelente sobrevivência a longo prazo entre os respondedores, como demonstrado em vários estudos realizados. (Tabela 3)

**Tabela 3:** Imunossupressão com GAT e ciclosporina na anemia aplástica grave (4, 6, 7)

Estudo	N	Idade média, anos	Resposta, %	Recidiva	Evolução clonal, %	Sobrevivência, %
NIH	55	28	78	26	8	62 em 3 anos
German e Austria	49	10	44	-	-	81 em 5 anos
German	84	32	65	19	8	58 em 11 anos
EBMT	100	16	77	12	11	87 em 5 anos
NIH	122	35	61	35	11	55 em 7 anos
Japan	119	9	68	22	6	88 em 3 anos
NIH	104	30	62	37	9	80 em 4 anos

Recentes evidências sugerem que os resultados da AA adquirida provêm da ativação anómala de um ou mais clones de células T auto-reativas devido à alteração de antígenos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (CPH) na superfície de células apresentadoras de antígeno (CAA). Esta alteração do antígeno pode ser desencadeada por diversos fatores como infecção viral, exposição química ou mutação genética, conduzindo à ativação inapropriada de antígeno-específico de células T efetoras e diminuição da atividade de células T reguladoras, que servem normalmente para evitar a autoimunidade. A ativação da célula T leva à expansão de IL-2-dirigidas e diferenciação de células T. Estas células pró-inflamatórias produzem uma variedade de citocinas, incluindo Fas-ligando (FASL), interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), que induzem apoptose nas células estaminais hematopoiéticas (CEH), alteram a regulação de genes e diminuem a síntese de proteína, impedindo o ciclo celular das CEH. Em última análise conduz à falência da medula óssea. (Figura 2)



**Figura 2:** Fisiopatologia da AA. Adaptado de (1)

A terapia imunossupressora interrompe assim a destruição de CEH conduzida pelas células T, inibindo respostas de células T em vários pontos ao longo desta via. (1)

Os agentes mais comumente utilizados como primeira linha são a globulina anti-timócitos (GAT) e a ciclosporina (CsA). O GAT tem o papel de esgotar as células T através da lise dependente do complemento e apoptose, a interferência com as propriedades funcionais das células apresentadoras de antígeno e indução de células reguladoras T e células T *natural killer* que estão profundamente diminuídas em doentes com AA.(8)

Vários estudos comprovam que GAT de origem equina (GATe) é preferida, sendo administrada numa dose de 40mg/kg/dia durante 4 dias (2, 9), em detrimento da GAT de coelho (GATc), demonstrando a primeira maior eficácia na avaliação da resposta hematológica e da sobrevivência (tabela 4). Num estudo randomizado do *National Institutes of Health* observou-se uma taxa de resposta hematológica aos 6 meses com GAT de cavalo de 68%, comparados com 37% de resposta com a GAT de coelho. A sobrevida global em 3 anos também difere, com uma taxa de sobrevivência de 96% no grupo de GAT cavalo, e 76% no GAT coelho.(10) Muitos outros estudos-piloto ou

retrospectivos comprovam que GAT do cavalo continua a ser a opção mais eficaz (Tabela 4) e mais segura com menor taxa de infecções.

Apesar de alguns estudos, como o da *Cleveland Clinic* (11) e um outro realizado por um grupo Coreano (12), mostrarem uma resposta semelhante, não há nenhum que aponte resultados significativamente superiores com GAT coelho como primeira terapêutica. Verifica-se assim que o GAT de coelho apenas deve ter primazia quando visa recuperar doentes refratários ou em recidiva após terapêutica inicial com GAT de cavalo.

**Tabela 4:** Estudos comparativos entre GAT cavalo/CsA e GAT coelho/CsA como terapêutica primeira linha em pacientes com AA (2, 17)

Estudo	Ano	Modelo	N	Preparação GAT	Resposta %	Sobrevida global, %
<b>Grupo Chinês</b>	2006	Prospetivo randomizado	79	Lymphoglobuline	79	81 em 5 anos
				Fresenius	53	66 em 5 anos
<b>Grupo Brasileiro</b>	2010	Retrospectivo	71	Lymphoglobuline	60	78 em 2anos
				Thymoglobuline	35	55 em 2 anos
<b>Cleveland Clinic</b>	2011	Prospetivo fase II, comparando com controlo histórico	87	GATAM	58	64 em 5 anos
				Thymoglobuline	50	65 em 5 anos
<b>NIH</b>	2011	Prospetivo, randomizado, fase III	120	GATAM	68	96 em 3 anos
				Thymoglobuline	37	76 em 3 anos
<b>EBMT</b>	2012	Prospetivo fase II, comparando com controlo histórico	140	Lymphoglobuline	67	86 em 2 anos
				Thymoglobuline	60	68 em 2 anos
<b>Grupo Coreano</b>	2013	Retrospectivo	99	Lymphoglobuline	46	84 em 5 anos
				Thymoglobuline	49	83 em 5 anos
<b>Grupo Este Asia</b>	2014	Retrospectivo	455	Lymphoglobuline	60	92 em 10 anos
				Thymoglobuline	55	87 em 10 anos

GAT equina: Lymphoglobuline, GATAM  
 GAT de coelho: Fresenius, Thymoglobuline

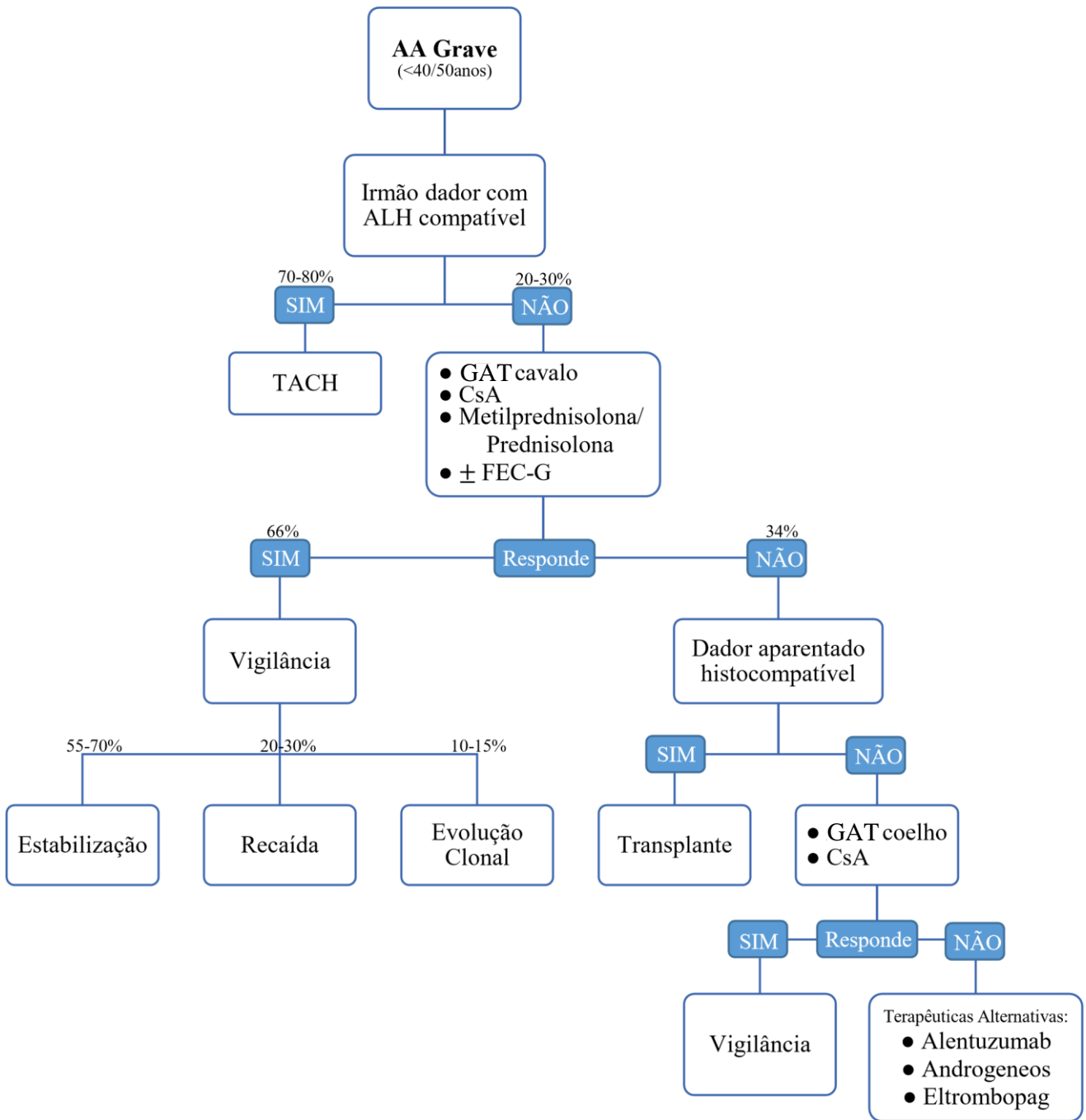
Como complicação da GAT desenvolve-se frequentemente a Doença do Soro, caracterizada por exantema, artralgia/artrite e febre, pelo que está preconizada a profilaxia com prednisolona ou metilprednisolona, administrada na dose de 1-2mg/kg, iniciada no dia 1 e continuada ao longo de 2 semanas (com redução gradual). A pré-medicação antes da administração de GAT com antipirético e anti-histamínico é convencional. Estão descritas algumas reações comuns à perfusão, como calafrios, febre, erupção cutânea ou hipoxemia que resolvem habitualmente com terapêutica sintomática. Na presença de reações potencialmente fatais, a infusão de GAT é adiada ou interrompida temporariamente até que os sinais de alarme e sintomas desapareçam.(2)

Ao contrário do GAT, a **ciclosporina** apresenta um efeito inibidor mais seletivo sobre os linfócitos T, suprimindo a resposta celular a estímulos antigénicos precoces e reguladores. Ao bloquear a expressão de proteínas reguladoras nucleares, leva à redução da proliferação das células T e à ativação com libertação diminuída de citoquinas.(13)

A ciclosporina inibe a produção de IL-2 de células T ativadas e impede a expansão das células T citotóxicas em resposta a IL-2. (8) Deve ser iniciada no dia 1 numa dose de 5-15 mg/kg/dia (em crianças) dividido em duas doses diárias durante pelo menos 12 meses e mais 12 meses com desmame lento (cerca 5-10%/mês), tentando manter níveis séricos de CsA de 200ng/mL. (2, 9) A CsA apresenta muitos efeitos secundários, contudo a manutenção das contagens de sangue pode ser conseguida com doses muito baixas, com toxicidade mínima.(4) O posterior desmame lento tem demonstrado eficácia para diminuição da taxa de recaída. Tal foi evidente num estudo retrospectivo italiano em crianças com desmame de 0.3-0.7mg/kg/mês que obtém 60% de recaída com a rápida descontinuação, em comparação com 7,6% no grupo de desmame lento. (14) Parece assim razoável propor um afunilamento lento da CsA com contínua monitorização clínica e do nível sérico. Um estudo retrospectivo recente da *Public Library of Science* apresenta ainda outra possível abordagem, afirmando que deve ser continuada indefinidamente uma baixa dose de CsA (15).

As taxas de resposta à terapêutica imunossupressora habitualmente são bastante favoráveis nos primeiros 3 meses após o início da terapêutica (cerca de 60%), podendo apresentar uma melhoria mais lenta com resposta em 6 ou mais meses.(16) (Esquema 1)

O caso posteriormente apresentado corresponde a uma criança de 13 anos diagnosticada com anemia aplásica grave que, por ausência de doador compatível, inicia TIS. O objetivo deste trabalho prende-se pela avaliação da resposta ao tratamento com ciclosporina e GAT de cavalo durante 12 meses, bem como das alternativas oportunas.



**Esquema 1** : Algoritmo para o tratamento da Anemia Aplásica Grave

## Caso Clínico

EMC, sexo masculino, 13 anos (nascimento a 12/10/2002), origem africana, natural de Cabo Verde e atualmente residente em Lisboa. Criança evacuada de Cabo-Verde para investigação de pancitopenia e terapêutica, ficando internada a 6/10/2014 na Unidade de Hematologia Pediátrica.

Trata-se de um primeiro filho de pais jovens, não consanguíneos. A mãe de 30 anos, natural e residente em Cabo Verde, estudante, com o 12º ano de escolaridade e saudável. O pai de 33 anos, natural de Cabo Verde e residente em Portugal há 7 anos, é fotógrafo e saudável. Tem uma meia-irmã de linha materna de 9 anos, que é saudável, tendo realizado avaliação analítica (Hb12.5 g/dL) na sequência do estudo do irmão. Sem história de outras doenças heredo-familiares. A gestação foi de termo, vigiada e sem intercorrências. Nega internamentos ou cirurgias prévias. Atualmente frequenta o 7º ano, com bom aproveitamento.

Criança aparentemente saudável até há cerca de 3 meses antes do internamento, altura em que inicia quadro de astenia, cansaço fácil, febre, gengivorragia e diminuição da ingestão. Foi observado no Hospital Regional de Santiago Norte, onde realiza avaliação analítica que revela hemoglobina 2.5 g/dL, hematócrito 7%, VGM 91 fL,  $1,5 \times 10^9/L$  leucócitos, neutrófilos  $0,72 \times 10^9/L$  e plaquetas  $3 \times 10^9/L$ . Fica internado e realiza concentrado eritrocitário. Ao segundo dia de internamento, por gengivorragia, foi transferido para o Hospital da Praia, onde se mantém de 17/08 até 6/10, realizando vários exames laboratoriais, dos quais o teste Coombs, aspirado de medula óssea e ecografia abdominal, com resultados inconclusivos.

A criança é evacuada de Cabo Verde, com internamento no Hospital de Santa Maria a 6/10/2014. Objetivamente à admissão, a destacar razoável estado geral, mucosas descoradas e hidratadas, sem sinais de discrasia cutâneo-mucosa e sem organomegalias palpáveis. Analiticamente, denota-se uma anemia normocítica (Hb7,4g/dL), leucócitopenia ( $1,14 \times 10^9/L$ , neutrófilos  $0,29 \times 10^9/L$ , linfócitos  $0,85 \times 10^9/L$ ), reticulócitos  $16 \times 10^9/L$  e trombocitopenia ( $25 \times 10^9/L$ ). Esfregaço de sangue periférico sem células atípicas. Estudo da função renal e hepática, ácido úrico, LDH, VS, ácido fólico e vitamina B12 sem alterações. Teste Coombs direto e indireto negativos.

Da investigação etiológica realizada salienta-se o aspirado e a biópsia osteomedular a

15/10/2014 compatíveis com o diagnóstico de anemia aplásica adquirida: “... Medula com grande parte dos espaços medulares com acentuado edema e hemorragia intersticiais. Medula francamente hipoplásica, predominantemente adiposa, observando-se raríssimos elementos das três linhagens hematopoiéticas com maturação...”. Consequentemente faz colheitas para tipagem de ALH.

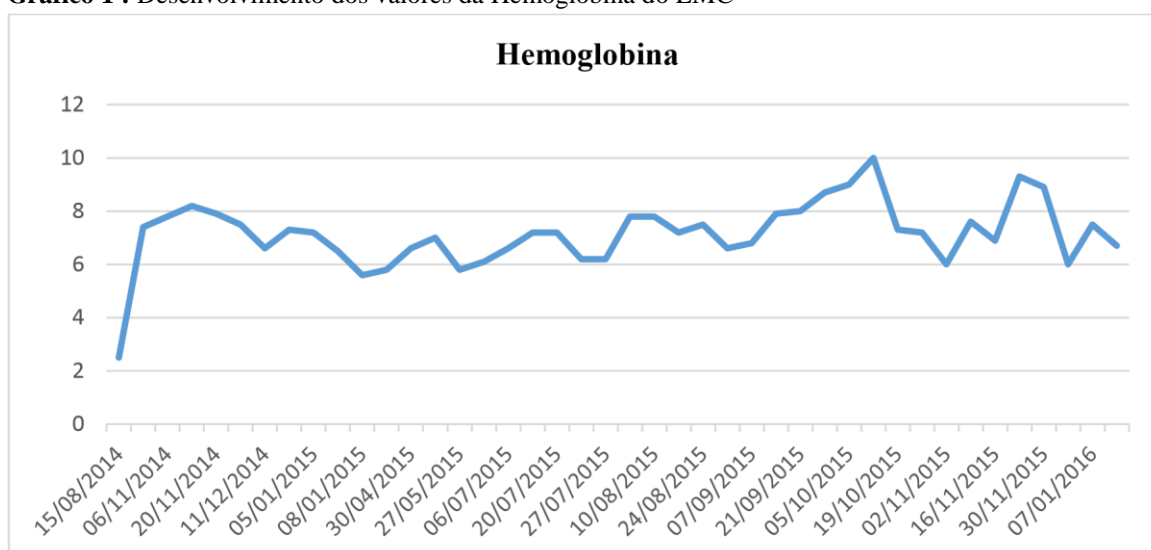
Aquando da punção para biópsia óssea, ocorreu uma hemorragia importante pelo que foi realizado estudo da coagulação com TP, aPTT, fibrinogénio e doseamento de fator XIII, que se revelaram normais. Não foi realizado estudo funcional plaquetário por manter trombocitopenia persistente, que impossibilita interpretação de resultados.

Estudo de autoimunidade e serologias virais sem alterações. Análise de células de sangue periférico com teste ao DEB negativo, não consistente com um diagnóstico de Anemia de Fanconi.

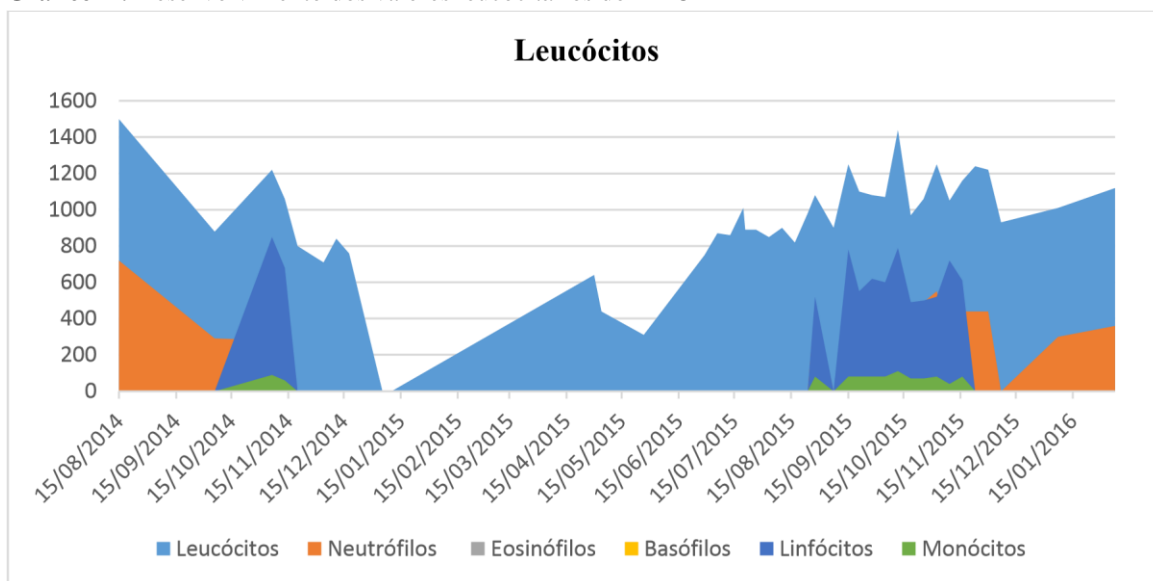
Ecografia abdominal sem hepatoesplenomegalia e sem alterações renais ou na bexiga perceptíveis.

Doente tem alta a 29/10/2014 clinica e analiticamente estável, sem sinais de discrasia hemorrágica, iniciando incessantemente reavaliações em Hospital Dia de Hematologia Pediátrica, com necessidade de transfusões de concentrado plaquetário e eritrocitário semanalmente ou quando agudiza, tal como se observa pelos seus valores hematológicos basais. (gráficos 1, 2 e 3)

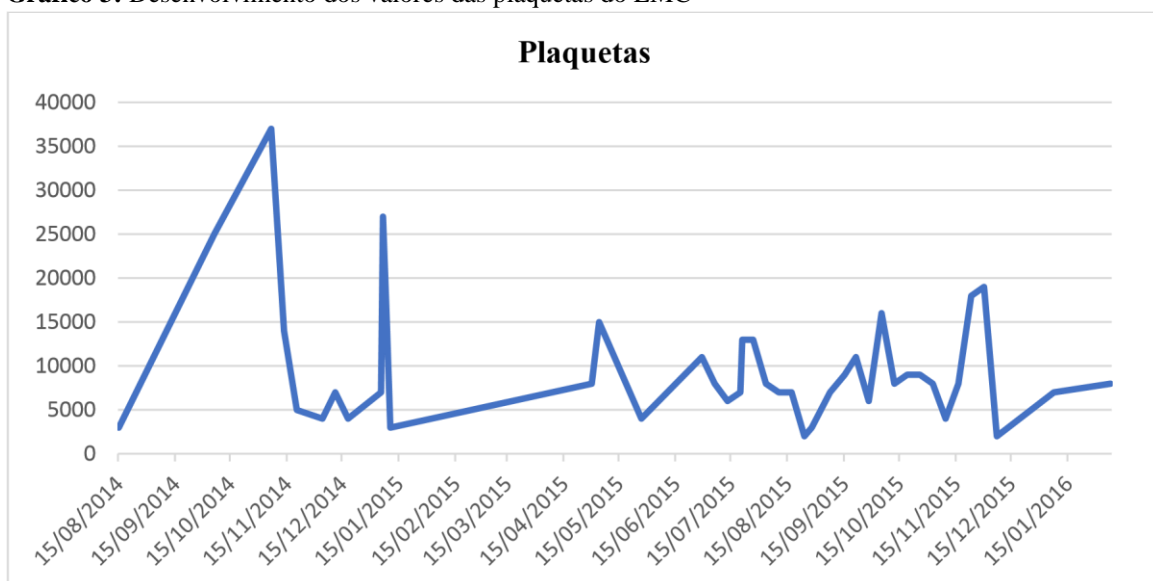
**Gráfico 1 :** Desenvolvimento dos valores da Hemoglobina do EMC



**Gráfico 2 :** Desenvolvimento dos valores leucocitários do EMC



**Gráfico 3:** Desenvolvimento dos valores das plaquetas do EMC



Fez genotipagem ALH para transplantação de progenitores hematopoiéticos onde não foram encontrados dadores, pelo que é proposto para terapia imunossupressora e pedido GAT de cavalo. Passados dois meses, coloca cateter venoso central de longa duração subclávio, mantendo as avaliações periódicas com necessidade de transfusões e

gengivorragias recorrentes maioritariamente autolimitadas. De intercorrências, a referir internamento de 11 semanas por neutropénia febril sem foco identificável com desenvolvimento de gastrite e esofagite de provável etiologia viral a citomegalovírus, medicado com ganciclovir e valganciclovir com boa resposta à terapêutica.

De 3 a 6/03/2015, efetua terapêutica com GAT de cavalo (GATAM) de 40mg/kg/dia, em perfusão 12/18h com pulsos de metilprednisolona de 60mg/dia de 3 a 7/03/2015. Cumpre prednisolona oral a 9/03 (dose de início de 1mg/kg/dia) que mantém em esquema de desmame até 20/04/2015, altura em que suspende corticoterapia. Inicia ciclosporina A a 6/03, que mantém à data de alta e faz FEC-G (Flingastrim) de 9/03 a 28/04/2015. Durante o internamento manteve-se dependente de transfusões de concentrados eritrocitário (CE) e plaquetário (CP) semanais.

Desde então, a referir dois internamentos por febre sem foco, pelo que em reunião multidisciplinar é decidido retirar o cateter venoso, a 18/06, e iniciar profilaxia com amoxicilina e ácido clavulânico. Doravante não volta a ter episódios febris. Mantém vigilância semanal no Hospital Dia, onde realiza CE e CP e controlo analítico, com ajuste adequado da dose da ciclosporina. Por ausência de resposta hematológica, e conforme protocolado, pesquisa-se GAT de coelho, a 28/09/2015, para eventual segundo ciclo de TIS.

Ao longo destes doze meses de terapêutica imunossupressora, EMC apresentou-se refratário à terapêutica, com necessidade de transfusões semanais para manutenção dos valores do hemograma perto da normalidade. Apresentou ainda algumas intercorrências com necessidade de internamento fundamentalmente febre sem foco ou discrasia hemorrágica, agravando a sua morbilidade.

## Discussão

Apesar do elevado sucesso da terapia imunossupressora com GAT de cavalo e ciclosporina A, a resposta global é alcançada apenas em cerca de dois terços dos pacientes. A incidência cumulativa de recaídas nos doentes respondedores é aproximadamente 20% - 30% e a evolução clonal é cerca de 10% - 15% dos casos. (15, 17, 18) Estudos apoiam que apesar de a recaída não se correlacionar com o pior prognóstico, pacientes refratários ao fazer GAT, têm tido um pior resultado. (19) Em relação ao nosso doente que apresenta diagnóstico de Anemia Aplásica Grave, não obtendo qualquer tipo de resposta à terapêutica de primeira linha, é classificado, de acordo com os critérios de classificação (tabela 5), como AA sem resposta, pelo que o seu prognóstico não se prevê muito favorável.

**Tabela 5:** Classificação do tipo de resposta à terapia na AA (1)

<b>Resposta Completa</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Independência de transfusão de eritrócitos e plaquetas</li><li>• Neutrófilos (absoluto) <math>&gt; 1.500 \times 10^6/L</math></li><li>• Plaquetas <math>&gt; 150\,000 \times 10^6/L</math></li></ul>
<b>Resposta Parcial</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Melhoria da citopenia com neutrófilos (absoluto) <math>\geq 500 \times 10^6/L</math> e plaquetas <math>\geq 20,000 \times 10^6/L</math></li><li>• +/- Dependentes de transfusões</li></ul>
<b>Sem Resposta</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Continua a cumprir critérios de AAG</li><li>• Dependência contínua de transfusões</li></ul>
<b>Recaída</b>	<input type="checkbox"/> Cumpre requisitos de AAG ou AAMG após a resposta inicial

Com o objetivo de aumentar a resposta à terapêutica de primeira linha, e diminuir intercorrências, têm sido estudadas novas terapêuticas adicionais ou alternativas.

As infeções ocorrem com bastante frequência durante a imunoterapia, principalmente durante o primeiro mês de diagnóstico, associadas a neutropénia relacionada com a doença. A **FEC-G** é uma glicoproteína que estimula a sobrevivência, proliferação, diferenciação e a função das células progenitoras de neutrófilos granulócitos e neutrófilos maduros. A adição de FEC-G (filgrastim ou lenograstim) tem sido implementada com o objetivo de reduzir a mortalidade relacionada com infeção ( $5\mu g/kg/dia$ ). Embora não esteja uniformizado, devido ao conflito de resultados e dados insuficientes, a sua administração pode ser realizada durante os primeiros 30 dias de

tratamento e além destes em episódios infecciosos em pacientes neutropénicos. Tal também foi verificado no nosso doente, que realizou o FEC-G sem complicações. De facto, o FEC-G tem demonstrado aumentar os neutrófilos, reduzir infeções, dias hospitalização (20) e incidência de recidiva (15% vs 42%), com taxa de resposta hematológica aos 6 meses superior (77% vs 57%). (21)

Contudo, os resultados não têm sido sempre unânimes, sendo que um estudo randomizado do *European Group for Blood and Marrow Transplantation* realça que FEC-G não afeta a sobrevida global, a sobrevida livre de eventos, remissão, taxa de recaída ou mortalidade. (22) As complicações do FEC-G prendem-se com um maior risco de evolução clonal, razão pela qual não tem sido usado no nosso doente persistentemente. Estudos sugerem uma ligação entre o uso de FEC-G e o aumento da incidência de síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda após terapêutica imunossupressora (TIS). (20)

Até agora, ainda nenhuma terapêutica adicional mostrou resultados que sustentem ser protocolados como primeira linha, sendo importante a aposta em novos estudos. No caso clínico apresentado, o EMC apesar de apresentar valores analíticos sustentáveis, manteve-se dependente de transfusões semanais e sofreu algumas intercorrências com necessidade de hospitalizações, apresentando-se refratário à terapêutica com GATe/CsA. Neste terço de doentes que não responde à terapêutica, é consensual da maioria dos especialistas que para os mais jovens seja considerado o transplante de dador não aparentado, principalmente se for identificada uma combinação genética de alta resolução (Tabela 6).

**Tabela 6:** Estudos de doador não aparentado transplante de células tronco no SAA (2)

Estudo (ano)	Designação	N	Condição	Idade média (anos)	Falência Excerto	Sobrevida %
<b>Maury</b> (2007)	Retrospectivo	89	Vários	17	14	42 em 5anos
<b>Viollier</b> (2008)	Retrospectivo	349	Vários	18	11	57 em 5anos
<b>Kosaka</b> (2008)	Prospectivo	31	Cy/GAT/TBI; Flu/Cy/GAT/TBI	8	16	93 em 3anos
<b>Perez-Albuerne</b> (2008)	Retrospectivo	195	Vários	10	15	51 em 5anos
<b>Bacigalupo</b> (2010)	Retrospectivo	100	Flu/Cy/GAT; Flu/Cy/GAT-TBI	20	17	75 em 5anos
<b>Kang</b> (2010)	Prospectivo	28	Flu/Cy/GAT	13	0	68 em 3 anos
<b>Yagasaki</b> (2010)	Retrospectivo	31	Vários	9	3	94 em 5 anos

Estudos que incluem 4 ou mais regimes de condicionamento são relatados como "vários". Cy indica ciclofosfamida; TBI, irradiação total do corpo; Flu, fludarabina;

Em doentes sem dador histocompatível como o caso do EMC, ou não adequados para o transplante, a melhor opção é um segundo curso de imunossupressão com **GAT coelho**/CsA com eficácia entre os 30 e os 70%. (23, 24) De facto, o GAT coelho e a ciclosporina têm assumido papel de destaque em doentes refratários à terapêutica de primeira linha ou com recidiva. O GAT de coelho parece ser mais imunossupressor clinicamente, sendo observada uma linfopénia mais prolongada.

Apesar de haver melhor entendimento da patogénese da AAG, ainda estão em falta métodos para prever a resposta à TIS. Critérios propostos até à data têm sido complexos ou baseados em testes não-padronizados. Uma análise retrospectiva do NIH concluiu que a contagem da linha de base absoluta de reticulócitos (CAR) e contagem absoluta de linfócitos (CAL) combinados, apresentam-se como um bom preditor de resposta à TIS: pacientes com um  $CAR \geq 25.000/\mu L$  e  $CAL \geq 1.000/\mu L$  no início do estudo tinham uma taxa de resposta de 80% em comparação com 40% (quando  $CAR < 25.000/\mu L$  e  $CAL < 1000/\mu L$ ). A idade mais jovem, nomeadamente inferior a 18 anos, também é correlacionada com uma melhor resposta. (13) Em outros estudos, pacientes com ALHDR15, citogenética normal e clone de hemoglobinúria paroxística noturna apresentaram maior taxa de resposta global e qualidade de resposta.(25) A medição do comprimento dos telómeros e resposta hematológica também permitem estratificar o risco. Num relatório da NIH, o menor comprimento dos telómeros nos leucócitos não foi associado com a resposta, mas foi associado com risco de recaída (cerca de duas vezes), evolução clonal e sobrevida global em pacientes com AAG recebendo terapia imunossupressora.(26) O nosso doente apesar de apresentar idade inferior a 18 anos, no início do estudo tinha  $CAR 16\ 000/\mu L$  e  $CAL 850/\mu L$ , pelo que, baseado nestes valores, se poderia prever uma fraca resposta à terapêutica imunossupressora, como de facto aconteceu. Como atualmente preconizado, EMC irá começar um novo ciclo de imunossupressão com GAT de coelho. Caso não responda, temos outras alternativas disponíveis que têm sido exploradas com resultados promissores, como o alemtuzumab, eltrombopag e androgéneos, apesar de os resultados serem extrapolados de dados obtidos em adultos.

O **alemtuzumab**, é um anticorpo monoclonal humanizado, que quando associado a baixas doses de CsA tem mostrado resultados promissores. Um estudo prospetivo em adultos do EBMT conclui alemtuzumab subcutânea como um regime TIS viável e

suficientemente seguro para os pacientes que sofrem falência da medula mediada pelo sistema imunológico, seguido de CsA em baixas doses. Apresentou uma taxa de resposta total de 58% para anemia aplástica grave, com eventos adversos clinicamente irrelevante e raros eventos infecciosos.(27) Outra experiência realizada pelo NIH descreve o alemtuzumab como um agente ativo na AAS em monoterapia (sem CsA), com uma taxa de resposta de 37% para doença refratária e de 56% para recidiva, com sobrevivência em 3 anos superior a 80%. Assim, alemtuzumab é uma alternativa atraente para GAT e ciclosporina no cenário da doença recidiva ou refratária, especialmente em doentes que sofreram toxicidade significativa com cursos de GAT, em pacientes mais velhos, e naqueles que requerem terapêutica crônica com ciclosporina para manter as contagens de sangue adequadas.(28)

Um análogo do recetor de trombopoietina, **eltrombopag**, também demonstrou mudanças significativas nas contagens de sangue ou não dependência de transfusão num ensaio clínico de fase II com pacientes com AA refratária ao tratamento imunossupressor. Uma resposta hematológica sustentada foi observada em 44% dos doentes com anemia aplásica grave refratária e com efeitos tóxicos mínimos, apresentando às 12 semanas uma resposta hematológica em pelo menos uma linhagem. Biópsias da medula óssea de série demonstraram normalização da tri-linhagem da hematopoiese em pacientes que tiveram uma resposta, sem aumento da fibrose.(29) No seu estudo subsequente, a resposta hematológica em pelo menos uma linhagem foi observada em 40% dos pacientes inscritos, incluindo 16,3% com resposta da tri-linhagem. Contudo, é de notar um desenvolvimento posterior de anomalias congénitas clonais após 3-13 meses da administração do eltrombopag em 18.6% dos participantes neste estudo.(30)

Os **androgéneos** foram amplamente utilizados no tratamento da AA durante muitas décadas antes da disponibilidade de imunossupressores. Continuam a ser alvo de estudo como terapêutica, com resultados ainda inconclusivos. Embora não tenham demonstrado melhora significativa nas taxas de resposta, quando combinado com GAT (31), já foi considerado uma terapêutica hormonal com propriedades promissoras em alguns pacientes, particularmente com telomeropatias.(32) Nos pacientes refratários ao TIS e sem boas opções de TACH, pode ser oferecida terapêutica hormonal durante 3 meses.(2) Apresentam contudo efeitos colaterais importantes, como hepatotoxicidade e alteração de virilidade.(33)

Outras terapêuticas têm sido estudadas como alternativas aos fármacos de primeira linha, nomeadamente ao GAT de cavalo e ciclosporina, mas sem resultados convincentes.

O uso de **tacrolimus** tem sido explorado como alternativa à ciclosporina. Num estudo foi observado uma taxa de resposta completa de 88% para tacrolimus e 85% para a CsA, com tempo médio de 7 meses para a resposta, sem diferença significativa da sobrevida livre de recidiva e com perfil de toxicidade mais favorável. (34) Contudo os estudos ainda são insuficientes.

A **ciclofosfamida** é um fármaco imunossupressor que também demonstrou eficácia em doses elevadas como terapêutica inicial da AAG. Um estudo de fase 2 realizado na *Universidade Johns Hopkins* testou doses elevadas de ciclofosfamida (200 mg/kg) e demonstrou uma taxa de sobrevivência de 88%, resposta de 71% e uma sobrevida livre de eventos de 58%. (35) Infelizmente, este procedimento foi associada a neutropenia de longa duração e infeções fúngicas graves em 18,2%. Além disso, um estudo randomizado realizado no NIH, comparando doses elevadas de ciclofosfamida e GATe/CsA, observou excesso de toxicidade e morte pelas infeções fúngicas invasivas no braço de ciclofosfamida, o que levou à rescisão do protocolo. Portanto, esta opção revela-se pouco aceitável. (36)

A adição de **micofenolato mofetil** e **sirolimus** à terapêutica de primeira linha, GAT e CsA, também foi estudada baseada na fundamentação teórica para a sua utilização, mas sem demonstração de qualquer melhoria na sobrevivência (9), resposta, recidiva ou evolução clonal (37, 38).

Concluindo, apesar da elevada resposta à terapêutica de primeira linha com GAT de cavalo e ciclosporina, é necessário serem realizados mais estudos para alternativas face a comportamentos refratários, observados em cerca de um terço dos doentes. O EMC apresenta-se como paradigma desta situação, com algumas intercorrências e dependência de transfusões durante 12 meses da terapêutica imunossupressora realizada. Os mecanismos pelos quais alguns pacientes não conseguem recuperação hematológica ainda são impercetíveis. Foram apontadas várias causas prováveis, como um número de células demasiado pequeno para reconstruir a hematopoiese adequada, deficiência irreversível das células, uma etiologia não imuno-mediada, inadequação dos

agentes imunossupressores, a regulação negativa da hematopoiese por elementos estromais ou uma telomeropatia subjacente. (2, 39)

Atualmente, doentes sem dador histocompatível, como o caso apresentado, ou não adequados para o transplante, a melhor opção é um segundo curso de imunossupressão com GAT coelho/CsA. No entanto, novas alternativas terapêuticas deverão ser exploradas pois esta apresenta resultados ainda pouco satisfatórios.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Dra. Maria João Palaré, por todo o apoio prestado na realização deste trabalho, desde a sugestão do caso clínico e tema, até ao término de todos os passos de desenvolvimento, bem como a todos os que contribuíram direta ou indiretamente.

## Bibliografia

1. Hartung HD, Olson TS, Bessler M. (2013) Acquired aplastic anemia in children. *Pediatr Clin North Am.*60(6):1311-36.
2. Scheinberg P, Young NS. (2012) How I treat acquired aplastic anemia. *Blood.*120(6):1185-96.
3. Gupta V, Eapen M, Brazauskas R, Carreras J, Aljurf M, Gale RP, et al. (2010) Impact of age on outcomes after bone marrow transplantation for acquired aplastic anemia using HLA-matched sibling donors. *Haematologica.*95(12):2119-25.
4. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. (2006) Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood.*108(8):2509-19.
5. Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe K, et al. (2014) First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor versus immunosuppressive therapy. *Haematologica.*99(12):1784-91.
6. Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D, Young NS. (1995) Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. *Blood.* 85(11):3058-65.
7. Fuhrer M, Rampf U, Baumann I, Faldum A, Niemeyer C, Janka-Schaub G, et al. (2005) Immunosuppressive therapy for aplastic anemia in children: a more severe disease predicts better survival. *Blood.*106(6):2102-4.
8. Shin SH, Lee JW. (2013) The optimal immunosuppressive therapy for aplastic anemia. *International journal of hematology.*97(5):564-72.
9. Miano M, Dufour C. (2015) The diagnosis and treatment of aplastic anemia: a review. *International journal of hematology.*101(6):527-35.
10. Phillip Scheinberg ON, Barbara Weinstein, Priscila Scheinberg, Angélique Biancotto, Colin O. Wu, and Neal S. Young. (2011) A randomized trial of horse versus rabbit antithymocyte globulin in severe acquired aplastic anemia. *The New England journal of medicine.*365(5):430-8.
11. Afable MG, 2nd, Shaik M, Sugimoto Y, Elson P, Clemente M, Makishima H, et al. (2011) Efficacy of rabbit anti-thymocyte globulin in severe aplastic anemia. *Haematologica.*96(9):1269-75.

12. Shin SH, Yoon JH, Yahng SA, Lee SE, Cho BS, Eom KS, et al. (2013) The efficacy of rabbit antithymocyte globulin with cyclosporine in comparison to horse antithymocyte globulin as a first-line treatment in adult patients with severe aplastic anemia: a single-center retrospective study. *Annals of hematology*.92(6):817-24.
13. Young NS, Scheinberg P, Calado RT. (2008) Aplastic anemia. *Current opinion in hematology*.15(3):162-8.
14. Saracco P, Quarello P, Iori AP, Zecca M, Longoni D, Svahn J, et al. Cyclosporin (2008) A response and dependence in children with acquired aplastic anaemia: a multicentre retrospective study with long-term observation follow-up. *British journal of haematology*.140(2):197-205.
15. Jalaiekhoo H, Khajeh-Mehrizi A. (2015) Immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia: a single-center retrospective study. *PloS one*.10(5):e0126925.
16. Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O, Young NS. (2003) Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome. *Jama*.289(9):1130-5.
17. Scheinberg P, Rios O, Scheinberg P, Weinstein B, Wu CO, Young NS. (2014) Prolonged cyclosporine administration after antithymocyte globulin delays but does not prevent relapse in severe aplastic anemia. *American journal of hematology*.89(6):571-4.
18. Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H. (2003) German Aplastic Anemia Study G. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year followup of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. *Blood*.101(4):1236-42.
19. Scheinberg P. (2012) Aplastic anemia: therapeutic updates in immunosuppression and transplantation. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*.2012:292-300.
20. Socie G, Mary JY, Schrezenmeier H, Marsh J, Bacigalupo A, Locasciulli A, et al. (2007) Granulocyte-stimulating factor and severe aplastic anemia: a survey by the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*.109(7):2794-6.

21. Teramura M, Kimura A, Iwase S, Yonemura Y, Nakao S, Urabe A, et al. (2007) Treatment of severe aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin A with or without G-CSF in adults: a multicenter randomized study in Japan. *Blood*.110(6):1756-61.
22. Tichelli A, Schrezenmeier H, Socie G, Marsh J, Bacigalupo A, Duhrsen U, et al. (2011) A randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia receiving antithymocyte globulin (GAT), cyclosporine, with or without G-CSF: a study of the SAA Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*.117(17):4434-41.
23. Di Bona E, Rodeghiero F, Bruno B, Gabbas A, Foa P, Locasciulli A, et al. (1999) Rabbit antithymocyte globulin (r-GAT) plus cyclosporine and granulocyte colony stimulating factor is an effective treatment for aplastic anaemia patients unresponsive to a first course of intensive immunosuppressive therapy. Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *British journal of haematology*.107(2):330-4.
24. Scheinberg P, Nunez O, Young NS. (2006) Retreatment with rabbit anti-thymocyte globulin and ciclosporin for patients with relapsed or refractory severe aplastic anaemia. *British journal of haematology*.133(6):622-7.
25. Shin SH, Lee SE, Lee JW. (2014)Recent advances in treatment of aplastic anemia. *Korean J Intern Med*. 29(6):713-26.
26. Scheinberg P, Cooper JN, Sloand EM, Wu CO, Calado RT, Young NS. (2010) Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. *Jama*.304(12):1358-64.
27. Risitano AM, Selleri C, Serio B, Torelli GF, Kulagin A, Maury S, et al. (2010)Alemtuzumab is safe and effective as immunosuppressive treatment for aplastic anaemia and single-lineage marrow failure: a pilot study and a survey from the EBMT WPSAA. *British journal of haematology*. 148(5):791-6.
28. Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Wu CO, Young NS. (2012)Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naive, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 119(2):345-54.
29. Olnes MJ, Scheinberg P, Calvo KR, Desmond R, Tang Y, Dumitriu B, et al. (2012) Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia. *The New England journal of medicine*. 367(1):11-9.

30. Desmond R, Townsley DM, Dumitriu B, Olnes MJ, Scheinberg P, Bevans M, et al. (2014;) Eltrombopag restores trilineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia that can be sustained on discontinuation of drug. *Blood*. 123(12):1818-25.
31. Champlin RE, Ho WG, Feig SA, Winston DJ, Lenarsky C, Gale RP. (1985) Do androgens enhance the response to antithymocyte globulin in patients with aplastic anemia? A prospective randomized trial. *Blood*. 66(1):184-8.
32. Najean, Yves, et al. (1986) Androgen therapy in aplastic anaemia: a comparative study of high and low-doses and of 4 different androgens. French Cooperative Group for the Study of Aplastic and Refractory Anemias. *Scandinavian journal of haematology*. 36(4):346-52.
33. Passweg JR, Marsh JC. (2010) Aplastic anemia: first-line treatment by immunosuppression and sibling marrow transplantation. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*.2010:36-42.
34. Alsultan A, Goldenberg NA, Kaiser N, Graham DK, Hays T. (2009) Tacrolimus as an alternative to cyclosporine in the maintenance phase of immunosuppressive therapy for severe aplastic anemia in children. *Pediatric blood & cancer*.52(5):626-30.
35. Brodsky RA, Chen AR, Dorr D, Fuchs EJ, Huff CA, Luznik L, et al. (2010) High-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia: long-term follow-up. *Blood*. 115(11):2136-41.
36. Socie G. (2010) Cyclophosphamide in aplastic anemia? *Blood*.115(11):2120-1.
37. Scheinberg P, Nunez O, Wu C, Young NS. (2006) Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclosporin and mycophenolate mofetil. *British journal of haematology*.133(6):606-11.
38. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Scheinberg P, Boss C, Sloand EM, et al. (2009) Treatment of severe aplastic anemia with a combination of horse antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without sirolimus: a prospective randomized study. *Haematologica*.94(3):348-54.

39. Young NS, Bacigalupo A, Marsh JC. (2010) Aplastic anemia: pathophysiology and treatment. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 16(1 Suppl):S119-25.