

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA TROMBÓTICA: UMA REVISÃO

Angélica de Paula Rosa<sup>1</sup>, Michelli Aparecida Bertolazo da Silva<sup>2</sup>

### Resumo

Este artigo de revisão traz informações a respeito da Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT), uma doença hematológica considerada grave, destacando principalmente o diagnóstico laboratorial da PTT, assim como sua importância e as dificuldades em padronizá-lo. Na PTT ocorre a formação de microtrombos que levam a uma oclusão da microcirculação, resultando em isquemia de tecidos. Tais microtrombos são constituídos por multímeros de fator *von Willebrand* (FvW) e plaquetas. Normalmente os multímeros de FvW (gmFvW) não são encontrados no plasma, mas na PTT ocorre o acúmulo destes. Isto ocorre principalmente pela deficiência da enzima *ADAMTS13* (*A Disintegrin and Metalloprotease with eight Thrombo Spondin-1-like*), responsável por clivar os multímeros de fator *von Willebrand* do plasma em unidades menores. A deficiência da *ADAMTS13* é apontada como a principal causa de PTT. A forma congênita da PTT é causada por uma mutação no gene *ADAMTS13*, enquanto na forma adquirida os autoanticorpos diminuem a atividade da *ADAMTS13*. Devido à urgência médica os níveis de *ADAMTS13* não são avaliados no diagnóstico inicial, pois resultados confiáveis não estão disponíveis em situações de emergência. Desse modo, um diagnóstico presuntivo é realizado baseado na apresentação clínica e achados laboratoriais. A presença de anemia hemolítica, esquistócitos e trombocitopenia determinam um diagnóstico prévio de PTT e o início do tratamento com plasmaferese. Como estes no hemograma são parâmetros inespecíficos, devem ser complementados posteriormente pela análise da *ADAMTS13*. Entretanto, ensaios *ADAMTS13* podem apresentar limitações associadas ao tempo de realização e interferentes. Diante disso, há grande necessidade de se desenvolver métodos que apresentem boa reprodutibilidade e que possam ser realizados em atendimentos de urgência nos casos de PTT. Ensaios rápidos de *ELISA* de atividade de *ADAMTS13* foram desenvolvidos, mas não têm grande precisão e sensibilidade.

**Palavras-chave:** Púrpura Trombocitopênica Trombótica. Fator Von Willebrand. *ADAMTS13*. *Thrombotic thrombocytopenic purpura*. Microangiopatias trombóticas.

### Abstract

This review article provides information about Thrombotic Thrombocytopenic purpura (TTP), a hematological disease considered to be serious, highlighting mainly the laboratory diagnosis of TTP, as well as its importance and the difficulties in standardizing it. In TTP occurs the formation of microthrombi that lead to an occlusion of the microcirculation, resulting in tissue ischemia. Such microthrombos consist of von Willebrand factor (VWF) multimers and platelets. Normally the VWF (gmVWF) multimeters are not found in plasma, but in TPP accumulation occurs. This is mainly due to the deficiency of the enzyme *ADAMTS13* (*A Disintegrin and Metalloprotease with eight Thrombo Spondin-1-like*), responsible for cleaving von Willebrand factor multimers from the plasma in smaller units. The deficiency of *ADAMTS13* is pointed out as the main cause of TTP. The congenital form of TTP is caused by a mutation in the *ADAMTS13* gene, whereas in the acquired form the autoantibodies decrease *ADAMTS13* activity. Due to medical urgency the levels of *ADAMTS13* are not evaluated at the initial diagnosis because reliable results are not available in emergency situations. Thus, a presumptive diagnosis is made based on clinical presentation and laboratory findings. The presence

1 Acadêmica do curso de Biomedicina, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. Endereço eletrônico: Angélica de Paula Rosa: angelicadepaula0312@gmail.com

2 Farmacêutica, Professora, Mestre, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. Endereço eletrônico: Michelli Bertolazo da Silva: michelli.silva@utp.br

of hemolytic anemia, schistocytosis and thrombocytopenia determine the prior diagnosis of TTP and the initiation of plasmapheresis treatment. As these in the hemogram are unspecific parameters, they should be complemented later by the analysis of ADAMTS13. However, ADAMTS13 trials may have time-related and interfering limitations. Given this, there is a great need to develop methods that have good reproducibility and that can be performed in urgent cases in TTP cases. ADAMTS13 activity ELISA rapid assays have been developed but do not have high accuracy and sensitivity.

**Keywords:** Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Von Willebrand Factor. ADAMTS13. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Thrombotic microangiopathies.

## 1. Introdução

A Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) é uma doença hematológica clássica, na qual ocorre a formação de microtrombos que frequentemente levam a uma oclusão de arteríolas e capilares da microcirculação, resultando em isquemia dos tecidos. Esses microtrombos são constituídos basicamente por multímeros de fator *von Willebrand* e plaquetas (PINTO, 2010; KISS, 2010; RÉTI *et al.*, 2012). Fator *von Willebrand* (*FvW*) é uma glicoproteína produzida e armazenada pelas células endoteliais e megacariócitos e tem como função promover a adesão das plaquetas ao endotélio lesado. Além disso, participa no processo de agregação plaquetária para formação de trombos (TONACO *et al.*, 2010; LIMA SILVA & RODRIGUES, 2015). A PTT é considerada uma doença rara, no mundo sua prevalência é de aproximadamente 10 casos / milhão de pessoas e tem uma incidência anual de 3,7-11 novos casos / milhão de pessoas e é duas vezes mais frequente em mulheres (SAID *et al.*, 2014; JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016).

Normalmente os multímeros de Fator *von Willebrand* (*gmFvW*) não são encontrados no plasma, mas na PTT ocorre o acúmulo de *gmFvW* de alto peso molecular na circulação. Tal situação se deve principalmente a deficiência da enzima *ADAMTS13* (*A Desintegrin and Metalloprotease with eight Thrombo Spondin-1-like*), responsável por clivar os multímeros de Fator *von Willebrand* do plasma em unidades menores. O acúmulo destes multímeros que não são removidos pela *ADAMTS13* provoca uma agregação plaquetária levando a formação de trombos que ocluem capilares da microcirculação (LOTTA *et al.*, 2010; TONACO *et al.*, 2010; TSAI, 2010; KOYFMAN, BRÉM & CHIANG, 2011; HOVINGA *et al.*, 2017).

A deficiência da *ADAMTS13* é apontada como a principal causa de PTT (TONACO *et al.*, 2010; PINTO, SOUZA & ANDRADE, 2013). Com base nessa deficiência, a PTT pode ser classificada como congênita ou adquirida. Na PTT congênita ocorre ausência ou redução da atividade de *ADAMTS13*, causada pela mutação no gene desta protease (KILERCİK *et al.*, 2014). Na maioria de casos congênitos, o primeiro ataque de PTT aguda pode ocorrer nos primeiros anos de vida ou permanecer assintomática até os 20-40 anos de idade. A partir da primeira crise de PTT aguda, os pacientes apresentam um quadro recidivante crônico. Os episódios recorrentes são geralmente desencadeados por processos secundários, como gravidez e ingestão de álcool (HOVINGA & LAMMLE, 2012; SCULLY *et al.*, 2012). A PTT Adquirida é subdividida em formas imunomediadas a

qual se observa a presença de autoanticorpos anti *ADAMTS13* e formas secundárias a qual ocorre liberação exacerbada de multímeros de fator *von Willebrand* pelas células endoteliais e baixos níveis da enzima *ADAMTS13* (TONACO *et al.*, 2010; KISS, 2010; KILERCİK *et al.*, 2014). Além disso, a *ADAMTS13* é sintetizada pelas células estreladas (também denominadas de células de Ito) no fígado, uma diminuição da sua síntese pode ocorrer em um quadro de insuficiência hepática (TSAI, 2010; JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016). Episódios agudos de PTT se desenvolvem quando há alto estresse de cisalhamento na microcirculação, desta forma o fator Von Willebrand (fvW) e plaquetas são propensos a formar trombos (LANSIGAN, ISUFI & TAGOE, 2011).

O presente trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão de literatura sobre o diagnóstico laboratorial da Púrpura trombocitopênica trombótica, principalmente as dificuldades encontradas para estabelecê-lo e a importância dos ensaios de *ADAMTS13* para o diagnóstico.

## 2. Metodologia

Este trabalho é uma revisão de literatura pesquisada nas seguintes bases de dados: Scielo, Google Scholar, Pubmed, Medline e Science Direct. Utilizando os seguintes descritores: Púrpura Trombocitopênica Trombótica, *ADAMTS13*, *Thrombotic thrombocytopenic purpura*, fator *Von Willebrand*, microangiopatias trombóticas. Foram pesquisados trabalhos dos últimos oito anos. As pesquisas foram realizadas de julho a novembro de 2018.

## 3. Discussão

A Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) foi descrita pela primeira vez em 1924 por Eli Moschowitz. Durante uma autópsia de uma menina de 16 anos foram observados diversos trombos hialinos ocluindo artérias (SAID *et al.*, 2014; HINOJOSA, MELLADO & ALMAGUER, 2016; HOVINGA *et al.*, 2017).

Em 1982 a fisiopatologia da PTT foi esclarecida, ao ser observado no plasma de um paciente com PTT recorrente multímeros de fator *von Willebrand (gmFvW)* de alto peso molecular. Foi proposto que na PTT as células endoteliais liberavam *gmFvW* de forma irregular e havia deficiência de uma protease responsável por clivar esses multímeros. Os *gmFvW* no plasma formavam agregação plaquetária intravascular promovendo trombose microvascular e hemólise mecânica. Em 2001, através de uma clonagem de genes e uma análise de sequenciamento de proteínas, foi identificada a protease que cliva os multímeros de fator *von Willebrand* como *ADAMTS13 (A Desintegrin and Metalloprotease with eight Thrombospondin-1-like)* (TONACO *et al.*, 2010; TSAI, 2010; JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016; HOVINGA *et al.*, 2017).

No ano de 1966, um estudo definiu uma pêntade de sinais clínicos para a enfermidade: Anemia Hemolítica Microangiopática, Trombocitopenia, febre, distúrbios neurológicos e renais. Porém, esta pêntade está presente em apenas 5% dos pacientes (PINTO, SOUZA & ANDRADE,

2013; ARNOLD, PATRIQUIN & NAZI, 2017; HOVINGA *et al.*, 2017). Por anos a PTT não possuía um tratamento efetivo e apresentava uma taxa de mortalidade de 90%, a plasmaferése tornou a doença curável e diminuiu a taxa de mortalidade para 20%, ela promove a correção da deficiência da *ADAMTS13* e remoção de autoanticorpos patogênicos e citocinas endotélio-estimulantes (PINTO, SOUZA & ANDRADE, 2013; SAID *et al.*, 2014; BENDAPUDI *et al.*, 2015; COPPO, 2017). Atualmente, a plasmaferése constitui a base do tratamento da PTT que deve ser realizado o mais rápido possível, por este motivo gerou-se uma urgência para o diagnóstico da PTT. Assim, a pênade de sinais clínicos foi revisada e os critérios diagnósticos sofreram um corte, apenas a presença de Anemia Hemolítica Microangiopática e Trombocitopenia determinam um diagnóstico inicial para PTT (GEORGE & NOURI, 2012; ANJOS, ARAUJO & REGO, 2013; BOMBLERY & SCULLY, 2014; SAID *et al.*, 2014).

### 3.1 Achados clínicos

A apresentação clínica geralmente é inespecífica e variável, pois está relacionada à localização de trombos microvasculares (KOYFMAN, BRÉM & CHIANG, 2011). A presença de isquemia microvascular no sistema nervoso pode causar sintomas como: cefaléia, parestia, afasia, deterioração cognitiva e acidentes isquêmicos transitórios. Pode ocorrer proteinúria e hematúria, porém, raramente insuficiência renal aguda. A disfunção renal não é tão marcada como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), um fator essencial para estabelecer um diagnóstico diferencial entre essas duas patologias (TSAI, 2010; HINOJOSA, MELLADO & ALMAGUER, 2016; TODOROVIC *et al.*, 2017). Embora o início da doença seja tipicamente súbito, manifestações incluindo fadiga, artralgia, mialgia e dor abdominal ou lombar são frequentemente relatados no momento do diagnóstico. Estudos de necropsia revelaram que os trombos microvasculares comuns na PTT estão presentes em quase todos os órgãos: particularmente no cérebro, coração, rins e trato digestivo. Esses quadros podem levar a falência múltipla de órgãos (HOVINGA *et al.*, 2017). Apesar da trombocitopenia presente em pacientes com PTT, são raras as complicações hemorrágicas como petéquias na pele, epistaxe, ou hemorragia gastrointestinal (TODOROVIC *et al.*, 2017).

A avaliação clínica inicial também deve ter como objetivo identificar a presença de causas secundárias (por exemplo, gravidez, doença autoimune, infecção pelo HIV), excluir outros processos microangiopáticos (por exemplo, coagulação intravascular disseminada) e identificar potenciais casos congênitos por meio de um histórico familiar completo (BOMBLERY & SCULLY, 2014).

### 3.2 Achados Laboratoriais

Os sintomas apresentados geralmente são inespecíficos, mas os testes laboratoriais revelam um conjunto específico de trombocitopenia e anemia com fragmentação dos glóbulos vermelhos na extensão sanguínea e evidência de hemólise (ARNOLD, PATRIQUIN & NAZI, 2017).

A PTT é uma urgência médica, por isso, um diagnóstico presuntivo deve ser realizado com base na apresentação clínica e achados laboratoriais. (HOVINGA *et al.*, 2017). Nesse sentido, o hemograma realiza um importante papel, devido à sua disponibilidade em ser efetuado e a apresentação de alterações clássicas de PTT encontradas. O hemograma apresenta classicamente: trombocitopenia que ocorre devido o consumo de plaquetas para formar microtrombos (principais achados histológicos), com uma contagem de plaquetas de  $10$  a  $30 \times 10^9 / L$ . A Anemia hemolítica é associada à fragmentação mecânica dos eritrócitos durante o fluxo através de pequenos vasos com alto cisalhamento e parcialmente ocluídos pelos microtrombos (TSAI, 2010; KOYFMAN, BRÉM & CHIANG, 2011; HINOJOSA, MELLADO & ALMAGUER, 2016; TODOROVIC *et al.*, 2017). Os níveis de hemoglobina estão geralmente abaixo de  $12g/dl$  e a extensão sanguínea apresenta hemácias policromatófilas, microesferócitos, esquistócitos e contagem elevada de reticulócitos, que representam tanto eritropoiese compensatória devido à hemólise intensa, como lesão da barreira vascular medular. (RUBIA, CONTRERAS & GARMA, 2011; ANJOS, ARAUJO & REGO, 2013; SAID *et al.*, 2014; LIMA, SILVA & RODRIGUES, 2015).

Nos exames laboratoriais observa-se aumento dos níveis da lactato desidrogenase (LDH) como marcador da isquemia tecidual e hemólise (RUBIA, CONTRERAS & GARMA, 2011; SAID *et al.*, 2014). São encontrados níveis baixos de haptoglobina. A haptoglobina liga-se a hemoglobina livre de eritrócitos lisados, prevenindo seus efeitos tóxicos. Como na PTT há grandes quantidades de hemoglobina livre devido à anemia hemolítica instalada, os níveis de haptoglobina se esgotam. A diminuição da haptoglobina é um marcador significativo de hemólise (SHIH, MCFARLANE & VERHOVSEK, 2014). O teste direto de *Coombs* é negativo. Testes de coagulação como: Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada e fibrinogênio apresentam-se normais, são testes importantes para diferenciar a PTT da Doença Intravascular Disseminada (CID), na CID esses valores estão alterados. (POLITO & KIRSZTAJN, 2010; SCULLY *et al.*, 2012).

Os testes laboratoriais e sinais clínicos citados não são específicos para PTT e podem estar presentes em várias outras microangiopatias trombóticas, portanto, eles devem ser complementados pela análise da *ADAMTS13*, o único marcador sensível e específico para a doença. Entretanto, vale ressaltar que o teste *ADAMTS13* não é necessário para o diagnóstico inicial e a tomada de decisão para o tratamento com plasmaferese, no entanto, pode ajudar a confirmar o diagnóstico e o risco do paciente de desenvolver PTT novamente (ZHENG, 2010; SAID *et al.*, 2014; JOLY, COPPO & VEYRADIÉ, 2016). O sangue deve ser retirado antes do tratamento para avaliar a atividade da *ADAMTS13*, mas essa não deve atrasar o início da terapia (SCULLY *et al.*, 2012).

### 3.3 A importância da *ADAMTS13* no diagnóstico da PTT

Atualmente, a compreensão referente à fisiopatologia e métodos diagnósticos das microangiopatias em geral teve avanços consideráveis. A descoberta da *ADAMTS13* e a definição do tratamento mais eficiente foram os dois maiores progressos relacionados à PTT (BRÉM & CHIANG, 2011; SCULLY *et al.*, 2012; ARNOLD, PATRIQUIN & NAZI, 2017; KOYFMAN).

Inicialmente a PTT foi caracterizada por uma pêntrade de sinais clínicos, já descritos neste trabalho. Para que se estabeleça rapidamente o tratamento os critérios diagnósticos que vêm sendo usados comumente são apenas trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática. (HOVINGA *et al.*, 2010; POLITO & KIRSZTAJN, 2010). Além da trombocitopenia e da anemia hemolítica, a PTT ocorre no contexto de deficiência grave de *ADAMTS13* apresentando <10% da atividade da enzima (ARNOLD, PATRIQUIN & NAZI, 2017; KOYFMAN, BRÉM & CHIANG, 2011).

O papel *in vivo* de *ADAMTS13* é clivar multímeros de fator de *von Willebrand* ativos em pequenos fragmentos de proteínas, o domínio A2 do *FvW* foi identificado como o local de clivagem pela *ADAMTS13*. Produzida no fígado pelas células estreladas, a *ADAMTS13* é uma proteína de 1427 aminoácidos com uma massa molecular calculada de 145 *kDa*, está localizada no cromossomo 9q34, ao ser clonada foi identificada como o 13º membro da *ADAMTS* (*Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*), pertencente da família de metaloproteases (CLAUS *et al.*, 2010; BOMBLERY & SCULLY, 2014).

A *ADAMTS13* é considerada o único marcador biológico específico para a PTT (JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016). Em fase aguda da PTT adquirida são encontrados no plasma de quase todos os pacientes (94-97%) anticorpos anti *ADAMTS13*, que inibem a atividade desta protease. Esses anticorpos são principalmente do isotipo IgG e da subclasse IgG. Níveis elevados destes são associados a um risco elevado de recidiva da doença. A PTT hereditária é menos comum, observa-se uma deficiência congênita de *ADAMTS13*, provocada por mutações no seu gene. Mais de 140 mutações em *ADAMTS13* já foram descritas, aproximadamente 60% dos pacientes apresentam mutações missense e 20% pequenas deleções e inserções (LOTTA *et al.*, 2010; HOVINGA & LAMMLER, 2012; TODOROVIC *et al.*, 2017).

Na última década, muita atenção tem sido dada aos mecanismos moleculares subjacentes ao controle da função do Fator *von Willebrand* (*FvW*) pela *ADAMTS13*. Uma diminuição na atividade da enzima (geralmente <10%) no plasma de um paciente com características clínicas de PTT, com ou sem a presença de um inibidor ou anticorpos IgG e associada com anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia confirma o diagnóstico de PTT (BOMBLERY & SCULLY, 2014; CRAWLEY *et al.*, 2011; SCULLY *et al.*, 2012).

### 3.4 Investigação da *ADAMTS13*

Foram desenvolvidos ensaios capazes de detectar a presença de inibidores enzimáticos e deficiências quantitativas e funcionais da enzima *ADAMTS13* associada à PTT (LANSIGAN, ISUFI & TAGOE, 2011). Os ensaios do diagnóstico devem abranger: atividade de *ADAMTS13*, inibidor funcional baseado em estudos de mistura e/ ou *anti-ADAMTS13* IgG. Este painel deve identificar corretamente os pacientes com PTT na maioria dos casos (SCULLY *et al.*, 2016).

Primeiramente deve ser avaliada a atividade da enzima *ADAMTS13*. Para isso há vários ensaios disponíveis, cujo princípio geral do método consiste em adicionar ao plasma citratado uma solução contendo o *FvW* (um substrato ou peptídeo pequeno de *FvW*) e subsequentemente clivá-

lo com *ADAMTS13*. A clivagem do substrato aumenta sua fluorescência e a taxa de aumento é proporcional à concentração de *ADAMTS13* ativa. Os produtos de clivagem podem ser detectados utilizando uma variedade de técnicas incluindo: de imunoenensaio, eletroforese e transferência de energia de ressonância de fluorescência (ensaio FRET). (ZHENG, 2010; BOMBLERY & SCULLY, 2014; SLADER, 2016). Os valores são geralmente expressos como porcentagem da atividade *ADAMTS13* em plasma normal agrupado definido como 100% e calibrado de acordo com o novo padrão internacional da Organização Mundial da Saúde. Alguns testes visam evidenciar o mecanismo que causa a deficiência grave da *ADAMTS13*: ensaios para autoanticorpos *ADAMTS13*, ou para a busca de um inibidor da *ADAMTS13* (JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016).

O ensaio *FREST-vWF73*, que utiliza um peptídeo de 73 aminoácidos derivado do domínio A2 central do *FvW* é considerado um teste referência e utiliza uma técnica de transferência de energia de ressonância de fluorescência para detectar a clivagem do peptídeo utilizado. É um teste comercial considerado simples, rápido e quantitativo, apresentando boa reprodutibilidade (HOVINGA *et al.*, 2017). No entanto, os resultados nem sempre consentem com aqueles obtidos por outros ensaios usando um multímeros de *FvW* como substrato (BOMBLERY & SCULLY, 2014; TODOROVIC *et al.*, 2017).

A atividade de ligação do colágeno (CBA) também é um método considerado de referência para medir a atividade da *ADAMTS13*, porém, o *FREST-vWF73* é ainda superior. O coeficiente de correlação relatado entre o *FRETS-vWF73* e o ensaio de *imunoblotting* ou ligação de colágeno é de aproximadamente 0,80 ou 0,83 para avaliar amostras clínicas. Portanto, a interpretação dos resultados do teste requer conhecimento do método que está sendo utilizado e da informação clínica do paciente (ZHENG, 2010; JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016).

Após ser identificada uma diminuição severa (<10%) na atividade de *ADAMTS13*, a próxima etapa na investigação é a detecção de autoanticorpos contra *ADAMTS13*, confirmando assim o diagnóstico de TTP adquirida (BOMBLERY & SCULLY, 2014). Os autoanticorpos *anti ADAMTS13* são detectados com ensaio imunoenzimático (*ELISA*) ou método de *Western blotting*. Esses anticorpos são encontrados em quase todos os pacientes com PTT adquirida. A deficiência grave de *ADAMTS13* sem anticorpos *anti ADAMTS13* é fortemente associado a diagnóstico de PTT congênita, o que pode ser confirmado por testes de sequenciamento do gene *ADAMTS13* (JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016; SADLER, 2016).

As medições da *ADAMTS-13* em intervalos regulares durante o tratamento e durante a remissão da PTT podem fornecer dados em relação ao risco de recidiva e persistência da atividade da doença subclínica (SCULLY *et al.*, 2016).

### 3.5 Limitações nos ensaios de *ADAMTS13*

A compreensão da fisiopatologia molecular da microangiopatia trombótica permite que o diagnóstico não dependa das variações nas características clínicas desses distúrbios. A PTT é

relativamente fácil de diagnosticar, pois a presença de deficiência grave da *ADAMTS13* é sensível e específica para a PTT congênita ou adquirida (SADLER, 2016). Embora a deficiência grave de *ADAMTS13* seja um achado específico de PTT, nem todos os pacientes apresentam deficiência grave de *ADAMTS13* na apresentação da doença. A fisiopatologia da PTT sem deficiência severa da *ADAMTS13* permanece desconhecida (ZAHND *et al.*, 2011).

Ensaio com a *ADAMTS13* são complexos e podem apresentar limitações. Uma restrição está associada ao tempo de realização, apesar da variedade de métodos para medir atividade enzimática, nenhum fornece tempo real resultados para a tomada de decisão clínica (SARODE *et al.*, 2013). Estes métodos de referência estão limitados a laboratórios especializados (geralmente um ou dois laboratórios por país), em muitos hospitais os ensaios *ADAMTS13* são enviados para um laboratório e os resultados retornam dias depois. Por essa razão também, o diagnóstico inicial de PTT deve ser baseado principalmente na presença de hemólise microangiopática e trombocitopenia, entretanto, tal situação pode gerar erros de diagnóstico, pois essas características podem ser encontradas em outras microangiopatias trombóticas, como resultado alguns pacientes podem não receber o tratamento adequado (SARODE *et al.*, 2013; SADLER, 2016).

Métodos de *Western blotting* são limitados a exames especializados ou laboratórios de pesquisa. Por tais motivos, é necessária a realização de um ensaio para a atividade de *ADAMTS13* que resulte em um diagnóstico preciso em um tempo curto, para evitar o tratamento em pacientes que não tem PTT, ou promover o tratamento para pacientes que tem PTT o mais rápido possível (SARODE *et al.*, 2013). Ensaio rápidos de *ELISA* comerciais para a atividade de *ADAMTS13* foram recentemente desenvolvidos, mas não têm a precisão e sensibilidade dos métodos de referência. Ensaio para autoanticorpos, principalmente titulação de anti *ADAMTS13* IgG com kits comerciais são facilmente realizados em laboratório. Estes ensaios são secundários, mas ao positivarem em um quadro de PTT aguda, reforçam o diagnóstico de PTT adquirida (HOVINGA & LAMMLE, 2012; JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016).

Os resultados confiáveis da investigação da *ADAMTS13* geralmente não estão disponíveis em situações de emergência, esta circunstância não é uma limitação para o diagnóstico inicial, pois os médicos usam outros critérios clínicos e laboratoriais para iniciar a plasmaferese (JOLY, COPPO & VEYRADIER, 2016). Uma amostra de sangue deve ser coletada antes do início do tratamento para seguinte investigação de *ADAMTS13*, esta estratégia evita qualquer interferência com *ADAMTS13* fornecida na plasmaferese durante o tratamento, pois o nível de *ADAMTS13* do paciente é essencial para confirmar definitivamente o diagnóstico da PTT (HOVINGA & LAMMLE, 2012).

O método *FRETS-VWF73* é afetado por hiperbilirrubinemia e hemoglobina livre, essas podem causar falsa deficiência de *ADAMTS13*, como a hiperbilirrubinemia e hemoglobina plasmática livre são achados comuns em pacientes com hemólise, este é um erro frequente nos testes (SARODE *et al.*, 2013; BENDAPUDI *et al.*, 2015; HOVINGA *et al.*, 2017). Por esta razão, o plasma do paciente é diluído 15 vezes a 30 vezes para minimizar a interferência de compostos coloridos, como bilirrubina



e hemoglobina livre. Além disso, a maioria dos ensaios é feita em pH 6 e baixa força iônica, assim a *ADAMTS13* tem atividade máxima e apresenta a sensibilidade necessária para diagnosticar PTT. O pH não fisiológico, baixa força iônica e alta diluição podem promover a dissociação de anticorpos inibitórios da *ADAMTS13*, aumentando artificialmente a atividade dessa protease (SADLER, 2016). Além disso, níveis elevados de Fator *von Willebrand* no plasma produzem níveis falsamente baixos de *ADAMTS13* em ensaios que não corrigem as concentrações de *FVW* no plasma. A interpretação dos resultados do ensaio *ADAMTS13* deve ser correlacionada com a apresentação clínica do paciente (TSAI, 2010).

## Conclusão

Embora seja uma doença rara, a PTT é o foco de muitas pesquisas devido à sua fisiopatologia complexa, taxa de mortalidade significativa e o alto risco de recidivas. De fato a descoberta da *ADAMTS13* modificou o cenário da PTT e proporcionou uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença. Embora a *ADAMTS13* apresente deficiência na maioria dos casos de PTT, há uma variabilidade desse biomarcador principalmente em relação a recidivas. Um novo desafio é poder determinar riscos de recaídas e outros fatores de risco potenciais além da avaliação de *ADAMTS13*. Além disso, os métodos para a atividade da *ADAMTS13* por vezes não estão disponíveis em condições de emergência e o diagnóstico é feito através do hemograma e sinais clínicos, se faz necessária a inserção de métodos sensíveis e específicos que sejam realizados mais rapidamente para que não haja erros na escolha do tratamento. O campo de pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos para medir atividade da *ADAMTS13* e até mesmo de novas terapias para PTT pode ser reconhecido pela biomedicina.

Em casos de PTT o início precoce do tratamento é crucial para a sobrevivência do paciente. Para isso, o diagnóstico da PTT é determinante para o início da terapia, porém este é complexo. Cabe ao profissional biomédico realizar o diagnóstico laboratorial da PTT, pois o laboratório tem um papel importante na identificação e descrição de alterações, especialmente as alterações clássicas da doença observadas no hemograma, dentre outros exames. Tais achados fornecem dados importantes para o entendimento do diagnóstico. Se a avaliação da *ADAMTS13* estiver disponível é fundamental que o profissional tenha domínio do método, pois há inúmeros interferentes e variações que afetam a atividade da *ADAMTS13*. O biomédico pode atuar realizando todos os testes descritos neste trabalho, inclusive o teste da *ADAMTS13*. Além disso, pode desenvolver pesquisas relacionadas a novos métodos diagnósticos da PTT que tenham maior reprodutibilidade, por exemplo.

## Referências

ANJOS, L.C; ARAUJO, M.de A.F; REGO, M. de P. J. Púrpura Trombocitopênica Trombótica: Dois relatos de casos. *Universitas: Ciências da Saúde*, vol. 11, no. 1, p. 71-74, 2013.

ARNOLD, D.M; PATRIQUIN, C.J; NAZY, I. Thrombotic microangiopathies: a general approach to diagnosis and management. *CMAJ*, vol.189, no. 4, p. 53-159, 2017.

BENDAPUDI, P.K; LI, A; HAMDAN, A; UHL, L; KAUFMAN, R; STOWELL, C; DZIK, W; MAKAR, R.S. Impact of severe ADAMTS13 deficiency on clinical presentation and outcomes in patients with thrombotic microangiopathies: the experience of the Harvard TMA Research Collaborative. *British Journal of haematology*, vol. 171, no. 5, p. 836-844, 2015.

BOMBLERY, P; SCULLY, M. Management of thrombotic thrombocytopenic purpura: current perspectives. *Journal of Blood Medicine*, vol.5, no.2014, p. 15-23, 2014.

COPPO, P. Management of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion Clinique et Biologique*, vol. 24, no.3, p. 148-153, 2017.

CLAUS, R.A; BOCKMEYER, C.L; SOSSDORF, M; LOSCHE, W. The Balance between von-Willebrand Factor and its Cleaving Protease ADAMTS13: Biomarker in Systemic Inflammation and Development of Organ Failure? *Current Molecular Medicine*, vol.10, no.2, p. 236-248, 2010.

CRAWLEY, J.T.B; GROOT, R; XIANG, Y; LUKEN, B. M; LANE, D.A. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood Journal*, vol. 118, no.12, p.3212-3221, 2011.

GEORGE, J.N; NOURI, Z.L. Diagnostic and therapeutic challenges in the thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndromes. *ASH Education Book*, vol. 2012, no.1, p. 604-609, 2012.

HINOJOSA, C.T; MELLADO, A.V; ALMAGUER, D.G. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Medicina Universitaria*, vol. 17, no. 69, p.234-239, 2016.

HOVINGA, A.J.K; COPPO, P; LÄMMLER, B; MOAKE, J.L; MYIATA, T; VANHOORELBEKE, K. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Natures Reviews. Disease Primers*, vol.3, no. 17020, p. 1-17, 2017.

HOVINGA, J.A.K; LÄMMLER, B. Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *ASH Education Book*, vol. 2012, no.1, p.610-616, 2012.

HOVINGA, J.A.K; VESELY, S.K; TERRELL, D.R; LÄMMLER, B; GEORGE, J.N. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Journal*, vol.115, no. 8, p. 1500-1511, 2010.

JOLY, B.S; COPPO, P; VEYRADIER, A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Journal*, vol. 129, no.21, p.2836-2846, 2016.

KILERCİK, M; COSKUN, A; SERTESER, M; INAN, D; UNSAL, I. Biological variations of ADAMTS13 and von Willebrand factor in human adults. *Biochemia Medica*, vol. 24, no.1, p-138-145, 2014.

KISS, J.E. Thrombotic thrombocytopenic purpura: recognition and management. *International Journal of Hematology*, vol.91, no.1, p. 36-45, 2010.

KOYFMAN, A. MD; BRÉM, E. MD; CHIANG, V.W.MD Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Pediatric Emergency Care*, vol. 27, no.11, p- 1085-109, 2011.

LANSIGAN, F; ISUFI, I; TAGOE C. E. Microangiopathic haemolytic anaemia resembling thrombotic thrombocytopenic purpura in systemic lupus erythematosus: the role of ADAMTS13. *Rheumatology*, Vol.50, no.5, p.824-829, 2011.

LIMA, T.N; SILVA, J.B.M; RODRIGUES, A.G. Púrpura Trombocitopênica: Auto-Imune e Trombótica. 6p. Monografia (Biomedicina) - Centro Universitário Amparense-UNIFIA, São Paulo, 2015.

LOTTA, L.A; GARAGIOLA, I; PALLA, R; CAIRO, A; PEYVAND, F. ADAMTS13 Mutations and Polymorphisms in Congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Official Journal Human Genome Variation Society*, vol.31, no.1, p. 11-19, 2010.

PINTO, A.P. de S; SOUZA, P.M.S; ANDRADE, S.L. Papel da Plasmaferese na terapêutica de purpura trombocitopênica trombótica: Revisão Sistemática. *Cadernos da Graduação- Ciências Biológicas e da Saúde Fits*, vol.1, no. 2, p. 61-66, 2013.

PINTO, L.N.S.Q. Implicações do Fator de von Willebrand na insuficiência renal induzida pelas microangiopatias trombóticas. 17 p. Monografia (Farmácia) -Universidade Vale do Rio Doce-UNIVALE, Governador Valadares, 2010.

POLITO, M.G; KIRSZTAJN, G.M. Microangiopatias trombóticas: púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica. *J. Bras. Nefrol*, vol.32, no. 3, p. 303-315, 2010.

RÉTI, M; FARKAS, P; CSUKA, D; RÁZSÓ, K; SCHLAMMADINGER, Á; UDVARDY, M.L; MADÁCH,K; DOMJÁN, G; BEREZKI, C; REUSZ, G.S; SZABÓ, A.J ; PROHÁSZKA, Z. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol.10, no.5, 2012

RUBIA, J de la; CONTRERAS, E; GARMA, J. del. R. Púrpura Trombótica Trombocitopênica. *Medicina Clinica (Barc)*, vol. 136, no. 12, p 534–540, 2011.

SAID, A.M.D; HADDAD, R.Y; STEIN, R.M.D; LERMA, E.V.M.D; FACP; FASN. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Disease-a-Month*, vol.60, no.2014, p.500-504, 2014.

SARODE, R; BANDARENKO, N; BRECHER, M.E; KISS, J.E; MARQUES, M.B; SZCZEPIORKOWSKI, Z.M; WINTERS, J.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura: 2012 American Society for Apheresis (ASFA) consensus conference on classification, diagnosis, management, and future research. *Journal of Clinical Apheresis*, vol. 29, no.3, p.148-167, 2013.

SCULLY, M; HUNT, B.J; BENJAMIN, S; LIESNER, R. PETER; PEYVANDI, F; CHEUNG, B; MACHIN, S.J. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *British Journal of Haematology*, vol. 158, no.3, p.323–335, 2012.

SCULLY, M; CATALAND, S; COPPO, P; RUBIA, J. de la; FRIEDMAN, K.D; HOVINGA, J.K; LÄMMLE, B; MATSUMOTO, M; PAVENSKI, K; SADLER, E; SARODE, R; WU, H. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *Journal of thrombosis and haemostasis*, vol. 15, no.2, p- 312-322, 2016.

SHIH, A.W.Y; MCFARLANE, A; VERHOVSEK, M. Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. *American Journal of Hematology*, vol. 89, no. 4, 2014.

SADLER, J.E. What's new in the diagnosis and pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2015, no. 1, p. 631–636, 2016.

TODOROVIC, Z; JOVANOVIC, M; TODOROVIC, D; PETROVIC, D; DJURDJEVIC, P. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Etiopathogenesis, diagnostics and basic principles of treatment. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, vol. 18, no. 1, p. 61-68, 2017.

TONACO, L.C; RIOS, D.R.A; VIEIRA, L.M; CARVALHO, M. das G; DUSSE, L.M.S. Púrpura trombocitopênica trombótica: o papel do fator von Willebrand e da ADAMTS13. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 32, no. 2, p.155-161, 2010.

TSAI, H.M. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *International Journal of Hematology*, vol. 91, no. 1, p. 1-19, 2010.

ZAHND, R.F; GEORGE, J.N; VESELY, S.K; TERRELL, D.R; ABOULFATOVA, K; DONG, J.F; LUKEN, B.M; VOORBERG, J; BUDDE, U; SULZER, I; LÄMMLE, B; HOVINGA, J.A.K. Evidence For A Role Of Anti-ADAMTS13 Autoantibodies Despite Normal ADAMTS13 Activity In Recurrent Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Haematologica*, vol.97, no.2, p. 297-303, 2011.

ZHENG, X.L. ADAMTS13 testing: why bother. *Blood Journal*, vol.115, no.8, p.1475-1476, 2010.