

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Julia Stocco da Silva

**Avanços e desafios nos métodos diagnósticos laboratoriais da
doença de von Willebrand: Uma revisão bibliográfica**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Avanços e desafios nos métodos diagnósticos laboratoriais da
doença de von Willebrand: Uma revisão bibliográfica**

Julia Stocco da Silva

MSc. Cristina Ferreira Ramos Rossetto

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Julia Stocco da.

Avanços e desafios nos métodos diagnósticos laboratoriais da Doença de Von Willebrand : uma revisão bibliográfica / Julia Stocco da Silva. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Cristina Ferreira Ramos Rossetto
Capes: 40101053

1. Técnicas de laboratório clínico. 2. Von Willebrand, Doença de. 3. Hemostasia.

Palavras-chave: avanços; diagnóstico laboratorial; doença de von willebrand; fator; hemostasia.

JULIA STOCCO DA SILVA

AVANÇOS E DESAFIOS NOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu-SP, 04 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

CRISTINA FERREIRA RAMOS ROSSETTO
Data: 05/12/2024 16:22:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. MSc. Cristina Ferreira Ramos Rossetto
Núcleo de Hematologia - Hemocentro HCFMB



Documento assinado digitalmente

CLAUDIA HELENA PELLIZZON
Data: 06/12/2024 07:44:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Claudia Helena Pellizzon
Instituto de Biociências de Botucatu



Documento assinado digitalmente

LUIS FERNANDO BARBISAN
Data: 06/12/2024 08:45:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan
Instituto de Biociências de Botucatu

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, aos meus pais e familiares, aos amigos e a todos os profissionais que cruzaram o meu caminho durante a minha jornada acadêmica, e ofereceram todo o apoio e incentivo essenciais para que eu conseguisse concluir a minha graduação da melhor maneira possível. Sou também muito grata por todos os conhecimentos e experiências que adquiri ao longo desses quatro anos da graduação, que certamente farão diferença em minha formação profissional.

Além disso, agradeço imensamente à Prof. MSc. Cristina Ferreira Ramos Rossetto e ao Biomédico Especialista em Hematologia Phillipe Franklin pela orientação, paciência, dedicação e assistência, que foram necessários para que este trabalho se tornasse possível.

RESUMO

A Doença de Von Willebrand (DVW) é uma patologia da coagulação caracterizada pela deficiência na quantidade e/ou função do Fator de Von Willebrand (FVW), uma das maiores glicoproteínas do plasma e crucial para o processo de hemostasia sanguínea. Nesse contexto, as diferentes deficiências determinam a variação nas manifestações clínicas e complexidade da doença. Para seu diagnóstico, é de suma importância a realização de exames laboratoriais capazes de identificar os tipos e subtipos da condição. Sob essa ótica, o presente trabalho possui o objetivo de analisar e descrever os diferentes métodos laboratoriais realizados para diagnosticar a doença de vW e seus diferentes tipos, contemplando avanços, particularidades e principais desafios. Para isso, foi realizada uma revisão bibliográfica baseada na busca por artigos científicos do período de 2014 a 2024, nas bases de dados PubMed (National Center for Biotechnology Information) e Google Scholar, utilizando descritores específicos. Além disso, incluiu-se artigos clássicos de períodos anteriores e livros sobre hematologia, avaliados como importantes para o entendimento dos temas abordados. Os resultados revelaram que atualmente existe uma ampla variedade de testes laboratoriais para diagnosticar os diferentes tipos e subtipos da doença, porém eles apresentam limitações capazes de afetar a acurácia diagnóstica. Nos últimos anos, avanços nos métodos diagnósticos demonstraram ter superado as limitações de alguns dos principais testes laboratoriais, mas a disponibilidade comercial deles ainda é limitada. Sendo assim, conclui-se que há uma necessidade de maior disponibilização dos novos testes nos diferentes laboratórios de hematologia, para um diagnóstico da DVW mais preciso e eficaz.

Palavras-Chave: avanços; diagnóstico laboratorial; doença de von willebrand; fator; hemostasia.

LISTA DE ABREVIACÕES

DVW - Doença de Von Willebrand

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FVW - Fator de Von Willebrand

FVIII - Fator Pró-Coagulante VIII

FVW:Ag - Determinação Plasmática do Antígeno Fator de Von Willebrand

FVW:RCo - Determinação da Atividade do Cofator de Ristocetina

FVW:RCo/FVW:Ag - Determinação da Relação entre Atividade do Cofator de Ristocetina e Determinação do Antígeno Fator de Von Willebrand

FVW:C – Determinação Quantitativa do Fator VIII coagulante

FVW:CB – Determinação da Ligação do Fator de Von Willebrand ao Colágeno

FVW:FVIIIb – Determinação da Capacidade de Ligação do Fator de Von Willebrand ao Fator VIII da coagulação

FVWpp – Análise dos Propeptídeos do Fator de Von Willebrand

FVW:GPIbR - Ensaio de Ligação do Fator de Von Willebrand ao receptor GPIb Recombinante

FVW:GPIbM - Ensaio de Ligação do Fator de Von Willebrand ao receptor GPIb mutante

LD-RIPA - Agregação plaquetária induzida pela Ristocetina em baixa dose

TS - Tempo de Sangramento

TTPA - Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificativa	2
1.2 Objetivos	3
2. METODOLOGIA	4
2.1 Tipo de Revisão	4
2.2 Coleta de dados	4
3. RESULTADOS	5
3.1 Relativo à Hemostasia sanguínea.....	5
3.2 Relativo à Doença de Von Willebrand	5
3.3 Relativo à Epidemiologia.....	6
3.4 Relativo ao Fator de Von Willebrand	6
3.5 Relativo à Classificação da DVW	8
3.6 Relativo aos Métodos diagnósticos laboratoriais.....	9
4. DISCUSSÃO.....	13
5. CONCLUSÃO	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

1. INTRODUÇÃO

Em primeiro lugar, a Doença de Von Willebrand (DVW) é um dos transtornos hemorrágicos hereditários mais comum, com uma prevalência de 1 caso por 10.000 indivíduos na população. (Leebeek; Eikenboom, 2016) Ela é caracterizada por mutações genéticas responsáveis por causar disfunções na quantidade e/ou função do Fator de Von Willebrand (FVW), uma glicoproteína plasmática de grande peso molecular que desempenha um papel crucial no processo de hemostasia sanguínea. (Leebeek; Eikenboom, 2016)

Em razão dos diferentes defeitos no FVW que os pacientes podem expressar, a doença apresenta uma variedade de manifestações clínicas, incluindo excessivos sangramentos mucocutâneos, sangramentos nasais (epistaxes), hematomas fáceis e sangramentos após procedimentos cirúrgicos, entre outros. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Essa variabilidade também está associada ao tipo da condição e severidade, que por sua vez, é influenciada diretamente pela deficiência específica estudada. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

O FVW é uma glicoproteína formada por multímeros de grande peso molecular, encontrada no plasma sanguíneo, e é responsável por intermediar o processo de adesão e agregação plaquetária, além de carrear o fator pró coagulante VIII (FVIII), evitando sua degradação. (Seidizadeh *et al.*, 2024) A sua quantidade plasmática é determinada por variáveis genéticas e ambientais, sendo a associação delas um fator predisponente para a manifestação da doença, e determinante para o grau de severidade. (Rezende; Figueiredo, 2021) Conforme Abou-ismail *et al.* 2023, os valores plasmáticos estão reduzidos nos indivíduos de grupo sanguíneo O, e aumentados em quadros inflamatórios e neoplasias.

A doença possui um padrão de herança autossômico, recessivo ou dominante, porém é mais frequentemente diagnosticada em mulheres, em virtude dos processos hemostáticos desafiadores que elas passam ao longo da vida, como menstruação, gravidez e período pós-parto. (Leebeek; Eikenboom, 2016; Seidizadeh *et al.*, 2024)

Além disso, a doença é ocasionada por diferentes mutações que ocorrem no gene FVW, os quais acarretam em disfunções quantitativas parciais (tipo 1), qualitativas (tipo 2) e quantitativas totais (tipo 3). (Lorenzi, 2006)

O tipo 1 é o mais prevalente na população, e corresponde à redução parcial na quantidade de FVW funcionalmente normal no plasma. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

O tipo 2 é caracterizado por deficiências qualitativas do FVW, afetando principalmente o desempenho de suas funções. (Seidizadeh *et al.*, 2024) No entanto, a quantidade plasmática do fator pode estar diminuída ou normal. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Adicionalmente, este tipo é

subdividido em subtipos (2A, 2B, 2M e 2N) de acordo com as mudanças estruturais e funcionais da glicoproteína. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

O tipo 3 consiste no tipo mais raro e grave da doença, e é caracterizado pela redução quase total do FVW no plasma e plaquetas. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Uma das principais consequências, é a diminuição significativa do FVIII, achado laboratorial que pode confundir o diagnóstico com Hemofilia A. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

A estratégia utilizada para diagnosticar a doença é baseada na análise integrativa dos sintomas clínicos do paciente e histórico familiar de sangramentos, em conjunto à realização de exames laboratoriais para confirmação. (Leebeek; Eikenboom, 2016)

No entanto, o diagnóstico da DVW torna-se desafiador por diversos fatores, tais como a complexidade da condição, variabilidade das taxas plasmáticas do FVW influenciadas por processos fisiológicos e limitações dos métodos diagnósticos laboratoriais. (Abou-ismail *et al.*, 2023) Em vista disso, a patologia apresenta um risco de ser subdiagnosticada, diagnosticada incorretamente ou sobrediagnosticada. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

Além disso, a taxa de subdiagnóstico da doença pode ser atribuída à falta de conhecimento dos fenótipos clínicos da doença por parte dos profissionais, além da disponibilização limitada e barreiras técnicas dos exames laboratoriais. (Rezende; Figueiredo, 2021)

Os testes laboratoriais são essenciais para a confirmação do diagnóstico, e possuem o objetivo de avaliar qualitativamente e/ou quantitativamente o FVW e FVIII, através de métodos que são divididos em testes de triagem, confirmatórios e especiais. (Brasil, 2008)

Nos últimos anos, avanços nos métodos diagnósticos da DVW surgiram com o princípio de superar as principais limitações dos testes atuais, principalmente os qualitativos. (Outida, 2022) Exames que eliminam o uso de reagentes específicos foram desenvolvidos para diminuir a variabilidade e baixa sensibilidade de alguns dos testes realizados. (Outida, 2022)

1.1 Justificativa

A DVW é um distúrbio da coagulação complexo, com grande variabilidade de manifestações clínicas, que estão relacionadas às diferentes deficiências no FVW. Além disso, essa heterogeneidade da condição, influência de determinantes genéticos e ambientais nas quantidades plasmáticas do fator e limitações dos testes laboratoriais contribuem para que o diagnóstico da doença seja um processo desafiador. O diagnóstico correto implica em um tratamento eficaz e evita a evolução em quadros de hemorragias mais graves. Portanto, faz-se

pertinente uma análise da literatura científica sobre as principais características da doença e seus métodos diagnósticos laboratoriais.

1.2 Objetivos

A presente revisão da literatura possui o principal objetivo de analisar os tipos da DVW e como são diagnosticados nos laboratórios de hemostasia. Ademais, busca-se descrever e compilar as principais informações dos testes laboratoriais, abrangendo avanços e desafios no diagnóstico da condição.

2. METODOLOGIA

2.1 Tipo de Revisão

Trata-se de uma revisão sistemática da literatura fundamentada na busca por artigos científicos contidos nas seguintes bases de dados: PubMed (National Center for Biotechnology Information) e Google Scholar.

2.2 Coleta de dados

Os descritores utilizados para a pesquisa, incluem: doença de Von Willebrand; fator de von willebrand; diagnóstico; avanços. As produções científicas contempladas no presente trabalho abrangem o período de 2014 a 2024, incluindo artigos clássicos (períodos anteriores), livros sobre hematologia e conteúdos disponibilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil.

3. RESULTADOS

3.1 Relativo à Hemostasia sanguínea

A hemostasia sanguínea é um processo fisiológico responsável pela contenção da perda de sangue, diante de um cenário de lesão vascular. (Lorenzi, 2006) Nessa situação, o organismo provoca uma vasoconstrição local e um fluxo sanguíneo alterado e turbilhonado, favorecendo a ativação das plaquetas e fatores da coagulação, por agora estarem transitando próximos das paredes dos vasos sanguíneos. (Lorenzi, 2006) A ativação desses elementos é crucial para o desempenho da função da hemostasia. (Lorenzi, 2006) O processo hemostático ocorre em duas etapas, a hemostasia primária, que sucede rapidamente após a lesão endotelial para desenvolvimento do tampão hemostático primário (plaquetário), e a hemostasia secundária, que acontece após a ativação das proteínas de coagulação para formação do tampão hemostático secundário, constituído de fibrina e mais resistente para regular a perda sanguínea. (Lorenzi, 2006) Além disso, a hemostasia é relevante para manter o fluxo sanguíneo normal no interior dos vasos, quando há uma alteração neste processo, o sangue pode extravasar e desencadear um processo hemorrágico. (Lorenzi, 2006) Essa condição é denominada de distúrbio da coagulação, caracterizado por alterações presentes nos vasos e/ou elementos de coagulação, prejudicando o mecanismo de hemostasia do organismo (Lorenzi, 2006)

3.2 Relativo à Doença de Von Willebrand

Segundo estatísticas de 2022 da Federação Mundial de Hemofilia, 103.844 indivíduos são portadores da DVW no mundo. Doença definida por ser um dos distúrbios da coagulação hereditários mais comum, e determinada pela deficiência na quantidade e/ou defeitos na função do FVW, uma glicoproteína plasmática de alto peso molecular que desempenha papel relevante no processo de hemostasia sanguínea. (Leebeek; Eikenboom, 2016)

A patologia é reconhecida pela ampla variabilidade de manifestações clínicas, dependente do defeito específico presente no FVW do portador, que irá determinar a severidade do fenótipo. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Os principais sintomas clínicos verificados nos portadores envolvem sangramentos na cavidade oral, nasal (epistaxes), gastrointestinal, fáceis hematomas, fluxo menstrual intenso (menorragia), sangramento prolongado de pequenos ferimentos, sangramentos após procedimentos cirúrgicos e odontológicos, sangramentos pós-parto, além de hemorragias intramusculares e nas articulações (hemartroses) observadas em portadores de tipos mais severos da doença. (Seidizadeh *et al.*, 2024) A pluralidade desses sinais clínicos é um dos fatores que torna o subdiagnóstico um risco. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

3.3 Relativo à Epidemiologia

De acordo com um levantamento internacional, existe uma grande variação na taxa de registros de indivíduos portadores da DVW no mundo, que é significativamente impactada pelo nível de renda dos diferentes países. (O'Sullivan *et al.*, 2023) Nos países de baixa renda, verificou-se uma predominância nos registros do tipo 3, em virtude da baixa qualidade dos sistemas de saúde em diagnosticar os outros tipos da patologia. (O'Sullivan *et al.*, 2023) Além disso, a condição apresentou maiores registros na Europa e Ásia central em comparação ao sul da Ásia, indicando que países de alta renda apresentam elevadas taxas, devido aos investimentos e suporte na promoção da conscientização, reconhecimento e diagnóstico da patologia nesses locais. (O'Sullivan *et al.*, 2023) Ademais, foi observado que a doença afeta majoritariamente as mulheres, mas uma taxa maior de registros de homens foi constatada nos países de baixa renda, possivelmente relacionado à baixa conscientização sobre distúrbios da coagulação em mulheres, preconceitos e difícil acesso à saúde. (O'Sullivan *et al.*, 2023) Em vista disso, o estudo evidencia a grande e relevante demanda por programas de saúde que promovam a capacitação dos profissionais para reconhecer e diagnosticar a doença. (O'Sullivan *et al.*, 2023)

3.4 Relativo ao Fator de Von Willebrand

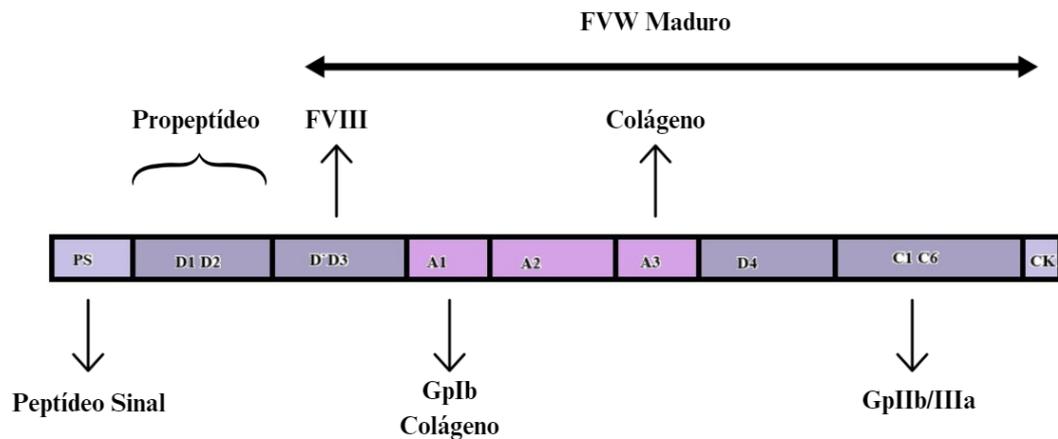
O FVW é uma grande glicoproteína presente no plasma e nas plaquetas, constituída por multímeros de elevado peso molecular, responsável por promover a ligação das plaquetas ao colágeno subendotélial exposto na lesão vascular (adesão plaquetária), ligá-las umas às outras (agregação plaquetária), além de transportar o FVIII da coagulação, protegendo-o de sua proteólise plasmática. É sintetizado pelas megacariócitos (precursores das plaquetas) e células endoteliais, e armazenado nos Grânulos α e nos corpos de Weibel-Palade de cada respectivo tipo celular, até sua liberação no plasma. (Hoffbrand *et al.*, 2006) A sua secreção ocorre por duas vias, a basal, que consiste na liberação constante para manutenção das taxas plasmáticas de FVW, e a estimulada, quando há liberação imediata de elevada concentração de multímeros de elevado peso molecular, formato no qual exerce maior função adesiva, para contenção de hemorragias. (Seidizadeh *et al.*, 2024;) Ademais, a quantidade plasmática é altamente influenciada por diversos processos fisiológicos e patológicos, apresentando-se elevadas no contexto de inflamação, atividade física, gravidez e neoplasias, e reduzidas nos indivíduos de grupo sanguíneo O, doenças cardíacas e autoimunes. (Abou-Ismael *et al.*, 2023)

Com relação ao ciclo de vida do FVW, ele é primeiramente sintetizado como um pró-polipeptídeo no retículo endoplasmático, local em que sofre o processo de dimerização.

(Leebeek; Eikenboom, 2016) Logo em seguida, é transportado para o complexo de golgi, onde ao obter contato com pH ácido e altos níveis de cálcio, sofrem multimerização. (Leebeek; Eikenboom, 2016) Somente assim, após formação dos multímeros, eles se organizam em hélices e passam a apresentar uma conformação tubular para armazenamento nos corpos de Weibel-Palade. (Leebeek; Eikenboom, 2016) Quando esses corpos se fundem à membrana plasmática, o pH no interior dos corpos aumenta e promove a perda da conformação tubular em longas cadeias de multímeros, que logo sofrem proteólise por parte das metaloproteinases ADAMTS13, em multímeros menores. (Leebeek; Eikenboom, 2016)

O FVW possui uma estrutura organizada em domínios, cada um responsável por se ligar a diferentes elementos envolvidos no processo de hemostasia. (Brasil, 2008) O monômero de VW é constituído por uma porção inicial formada pelo peptídeo sinal e propeptídeo, e uma porção madura formada pelos seguintes domínios: D'D3, que se ligam ao FVIII; A1, que se liga tanto ao receptor plaquetário GpIb, quanto ao colágeno; A3, que se liga somente ao colágeno; e C1C6, que se ligam ao receptor plaquetário GpIIb/IIIa. (Brasil, 2008)

Figura 1 - Estrutura do Monômero VW



Fonte: Elaborado pela Autora

Estimulado pelo fluxo sanguíneo turbilhonado em cenários de lesão vascular, o FVW ligado ao FVIII, transita da conformação globular inativa para seu formato linear ativo, no qual expõe os seus respectivos domínios de ligação. (Outida, 2022) Assim, ele consegue se ligar ao receptor das plaquetas GpIb e ao colágeno subendotelial para promover a adesão plaquetária, como também, interagir com o receptor GpIIb/IIIa promovendo a agregação plaquetária. Funções essenciais para a formação do tampão hemostático primário. (Brasil, 2008)

3.5 Relativo à Classificação da DVW

O mecanismo da fisiopatologia da DVW é baseado no advento de diferentes mutações no gene codificador do FVW, situado no braço curto do cromossomo 12, por essa razão, a condição apresenta uma transmissão autossômica, podendo ser recessiva ou dominante. (Leebeek; Eikenboom, 2016) Diante das diversas alterações genéticas, a doença apresenta diferentes tipos, sendo determinados pela deficiência específica. (Leebeek; Eikenboom, 2016) A redução na quantidade do FVW plasmático corresponde aos tipos 1 e 3, enquanto que, os defeitos na estrutura e função são classificados como tipo 2. (Leebeek; Eikenboom, 2016)

O tipo 1 apresenta um padrão de herança autossômico dominante, e corresponde à diminuição parcial na quantidade de FVW funcionalmente normal no plasma, devido a redução da sua síntese, armazenamento e/ou liberação, como também, aumento da sua depuração em casos específicos, como o tipo 1C. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

O tipo 2 apresenta uma transmissão autossômica dominante, e consiste nos diferentes defeitos na estrutura e função do FVW, que pode estar em níveis reduzidos ou dentro da normalidade. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Adicionalmente, o tipo 2 subdivide-se em subtipos de acordo com as alterações funcionais observadas, sendo eles:

- Tipo 2A - Consiste em defeitos nos processos de multimerização e/ou dimerização, além do aumento da suscetibilidade à proteólise pela ADAMTS13, que acarretam em uma diminuição da adesão plaquetária. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Além disso, esse subtipo apresenta uma redução ou ausência de multímetro VW de elevado peso molecular. (Seidizadeh *et al.*, 2024)
- Tipo 2B - Caracterizado por uma mutação de ganho de função que aumenta a afinidade do FVW pelo receptor GpIb das plaquetas, acarretando em uma redução dos grandes multímeros VW, além da formação de aglomerados plaquetários na circulação, que podem provocar uma plaquetopenia. (Seidizadeh *et al.*, 2024)
- Tipo 2M - Caracterizado por uma mutação de perda de função, que pode afetar os domínios de ligação à plaqueta ou ao colágeno, provocando uma diminuição da adesão plaquetária ou ligação ao colágeno subendotelial. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Ademais, é importante salientar que neste subtipo não há redução dos grandes multímeros VW. (Seidizadeh *et al.*, 2024)
- Tipo 2N - Apresenta um padrão de herança autossômico recessivo e consiste na ocorrência de uma mutação que reduz a capacidade do FVW de se ligar ao FVIII, aumentando a proteólise do FVIII livre e reduzindo seus níveis plasmáticos. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

O tipo 3 é o mais raro e severo da doença, apresentando um padrão de herança autossômico recessivo, e definido por uma redução significativa ou quase total do FVW funcionalmente normal no plasma. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Nesse tipo específico, é possível observar também uma redução na concentração plasmática do FVIII, parâmetro que pode levar a um diagnóstico incorreto de Hemofilia A. (Seidizadeh *et al.*, 2024)

3.6 Relativo aos Métodos diagnósticos laboratoriais

Segundo Roberts; Flood (2015), a DVW é considerada uma das doenças mais complexas de ser diagnosticada. Por isso, a estratégia diagnóstica dela compõe-se de uma análise integrada das manifestações clínicas do paciente e histórico familiar de hemorragias, como também, depende da execução de exames laboratoriais que discriminam os tipos e subtipos da doença. (Brasil, 2008)

Os métodos laboratoriais são realizados com o intuito de confirmar o diagnóstico, e avaliar quantitativamente e qualitativamente o FVW e FVIII coagulante, de maneira ampla e detalhada, visto que nos diferentes tipos da doença alguns parâmetros podem estar alterados, enquanto outros podem estar normais. (Rezende; Figueiredo, 2021) Para isso, os exames laboratoriais são divididos em: testes de triagem, testes confirmatórios e testes especiais. (Rezende; Figueiredo, 2021)

Os testes de triagem somente possuem valor diagnóstico quando associados ao histórico clínico do paciente e aos testes confirmatórios. (Lopes *et al.*, 2024) Isso em razão de somente serem capazes de verificar alterações que podem estar associadas ou não à doença, mas são relevantes para iniciar a investigação laboratorial. (Lopes *et al.*, 2024) Os testes envolvidos são:

- Tempo de Sangramento (TS) - Consiste em um teste que avalia a duração do tempo de sangramento após um corte realizado no antebraço do paciente. (Brasil, 2008) Ele pode ser realizado através de dois métodos: Método de Duke, baseado em uma punção realizada no lóbulo da orelha, e o Método de Ivy, no qual o corte é realizado por um equipamento que padroniza os parâmetros de tamanho e profundidade. (Brasil, 2008) Esse teste possui baixa sensibilidade e especificidade, em vista de também estar prolongado em outras condições. (Brasil, 2008) Por isso, o teste não é mais recomendado atualmente. (Brasil, 2008)
- Teste de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPA) - Consiste na avaliação dos fatores envolvidos na via intrínseca da coagulação. (Brasil, 2010) O teste pode apresentar-se prolongado devido à redução do FVIII nos tipos 1, 3 e subtipo 2N.

(Brasil, 2010) Nos outros tipos da patologia, irá apresentar resultados normais. (Brasil, 2010)

- Contagem de plaquetas - Caracteriza-se por uma avaliação da quantidade de plaquetas no sangue, capaz de identificar plaquetopenias, e que podem estar associadas ao subtipo 2B. (Rezende; Figueiredo, 2021)

Por outro lado, os testes confirmatórios são realizados para confirmar ou excluir a condição, e a repetição deles é recomendada para um diagnóstico confiável e adequado.

(Lopes *et al.*, 2024) Os exames envolvidos são:

- Determinação plasmática do antígeno FVW (FVW:Ag) - Define-se por uma avaliação quantitativa do FVW presente no plasma, realizada através da metodologia de ensaio imunoenzimático (ELISA) baseada na ligação específica de anticorpos aos antígenos da amostra do portador. (Ng; Motto; Di Paola, 2015) A concentração plasmática do FVW antígeno será reduzida nos tipos 1 e 3, enquanto que o tipo 2 pode apresentar um resultado normal. (Lopes *et al.*, 2024)

- Determinação da Atividade do Cofator de Ristocetina (FVW:RCo) - Avalia-se a função de interação do FVW com o receptor plaquetário GpIb, isto é, analisa o processo de agregação plaquetária *in vitro*, que é induzida pela presença do antibiótico Ristocetina. (Baronciani; Peyvandi, 2019)

- Determinação da relação entre FVW:RCo/FVW:Ag - Calcula-se a razão entre FVW:RCo/FVW:Ag, para distinguir os tipos 1 e 2 da patologia. No tipo 1, a redução na quantidade e qualidade do FVW é proporcional, por isso a razão é superior ou igual a 0,7. (Lopes *et al.*, 2024) Ao passo que, o tipo 2 apresenta uma redução desproporcional entre a quantidade e função do fator, assim, a razão apresentará um resultado menor que 0,7. (Lopes *et al.*, 2024)

- Determinação do Fator VIII coagulante (FVIII:C) - Consiste na determinação dos níveis plasmáticos de FVIII. (Ng; Motto; Di Paola, 2015) Nesse caso, os tipos 1 e 2N apresentam níveis reduzidos, mas não tão severamente reduzidos quanto no tipo 3, no qual é possível se aproximar dos níveis observados na Hemofilia A. (Ng; Motto; Di Paola, 2015)

Por último, os testes especiais são executados após a confirmação do diagnóstico, pois são responsáveis por diferenciar os diferentes subtipos da condição. (Ng; Motto; Di Paola, 2015) Essa identificação dos subtipos é imprescindível para o planejamento da conduta

terapêutica a ser seguida pelo paciente. (Ng; Motto; Di Paola, 2015) Os testes especiais abrangem os seguintes exames:

- Teste do padrão multimérico - Consiste em uma corrida de eletroforese em gel de agarose, capaz de distribuir os diferentes tamanhos de multímeros de VW do paciente. (Roberts; Flood, 2015) Assim, permitindo a avaliação dos níveis de multímeros de grande peso molecular, relevante para diferenciar os tipos 2A e 2B, que apresentam níveis reduzidos, do subtipo 2M, que, por sua vez, apresenta níveis normais. (Roberts; Flood, 2015) No entanto, este teste é custoso em termos de tempo de execução e não é realizado em todos os laboratórios. (Roberts; Flood, 2015)
- Ligação do FVW ao colágeno (FVW:CB) - Teste responsável por avaliar a ligação do FVW ao colágeno, através da metodologia ELISA. (Baroncini; Peyvandi, 2019) Além disso, ele é capaz de identificar subtipos da doença que apresentam uma perda de multímeros de alto peso molecular, como 2A e 2B, já que esses elementos são essenciais para a ligação do fator ao colágeno. (Sharma; Haberichter, 2019) Por isso, já vem sendo estudada a possibilidade de substituição do teste de padrão multimérico por esse elucidado. (Sharma; Haberichter, 2019) Já com relação ao subtipo 2M, ele é capaz de detectar somente tipos raros que apresentam mutações no domínio A3, que se liga ao colágeno tipo I e tipo III, utilizados especificamente neste exame. (Sharma; Haberichter, 2019) Por fim, a análise da razão FVW:CB-FVW:Ag é importante para diferenciar os subtipos 2A e 2B do 2M, já que nos dois primeiros vai estar reduzida, e o último se apresentará maior ou igual a 0,7. (Seidizadeh *et al.*, 2024) Visto que, no tipo 2M observa-se uma redução da ligação por um defeito no domínio ligante, e não pela ausência de grandes multímeros como nos outros tipos. (Seidizadeh *et al.*, 2024)
- Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em baixa dose (LD-RIPA) - Caracteriza-se pela adição de doses reduzidas de ristocetina, comparada com aquelas utilizadas no exame FVW:RCo, com o princípio de detectar uma hiperagregação plaquetária, isto é, identificar o subtipo 2B ou pseudo-DVW do tipo plaquetário, no qual há um defeito na função das plaquetas, e não no FVW como no primeiro. (Ng; Motto; Di Paola, 2015; Lorenzi, 2006) Para distinguir ambos, é preciso realizar um teste de mistura, que consiste na adição de plaquetas normais no plasma do paciente investigado, que ainda apresentará RIPA aumentado (hiperagregante) em casos de subtipo 2B, diferente do tipo plaquetário. (Brasil, 2008)

- Capacidade de ligação do FVW ao FVIII (FVW:FVIII:B) - Consiste na avaliação da capacidade de interação da glicoproteína ao FVIII, através de ELISA. (Ng; Motto; Di Paola, 2015) Teste sensível para detecção do subtipo 2N da doença. (Ng; Motto; Di Paola, 2015)
- Análise dos propeptídeos de VW (FVWpp) - Define-se pela determinação quantitativa dos propeptídeos de VW, relevante para diferenciar o tipo 1C, no qual ocorre uma redução do antígeno FVW, por conta do aumento na depuração do fator no organismo, mas não altera os níveis de propeptídeos. (Ng; Motto; Di Paola, 2015) Enquanto que, no tipo 1, ambos os parâmetros estarão reduzidos. (Ng; Motto; Di Paola, 2015)
- Testes genéticos - Caracterizados por análises moleculares, como sequenciamento genético, responsáveis por identificar os tipos da patologia. (Ng; Motto; Di Paola, 2015) No entanto, esses testes são limitados e de difícil interpretação, ao passo que o gene do FVW é extenso e apresenta alto grau de polimorfismo, além da presença de pseudogene altamente homólogo no cromossomo 22, que pode afetar diretamente a performance dos exames. (Ng; Motto; Di Paola, 2015) Desse modo, somente indica-se os testes genéticos para aconselhamento genético, acompanhamentos, orientação de tratamentos e diferenciação dos subtipos do tipo 2. (Roberts; Floods, 2015)

4. DISCUSSÃO

A literatura atual revelou que a pesquisa laboratorial é crucial para confirmar o diagnóstico da DVW. Uma vez que, seu principal objetivo é analisar qualitativamente e quantitativamente o FVW, além do FVIII que também pode trazer achados laboratoriais importantes. Conforme elucidado por Lopes *et al.* (2024), os testes dividem-se em três categorias: triagem, confirmatórios e especiais (classificatórios).

No entanto, de acordo com Abou-Ismael *et al.* (2023), as limitações dos testes laboratoriais atuais tornaram-se um dos desafios no diagnóstico da patologia. Os principais exames que apresentam limitações importantes incluem:

Tempo de sangramento - Possui baixa sensibilidade e especificidade, e seu uso não é mais recomendado para diagnóstico da condição. (Brasil, 2008)

TTPA - Pouco específico e informativo para a detecção da condição, pois pode se apresentar normal em portadores de tipos menos severos. (Baronciari; Peyvandi, 2019)

Padrão de multímeros - Baixa reprodutibilidade do método com qualidade e restrita utilização do teste em laboratórios especializados. (Baronciari; Peyvandi, 2019)

FVW:CB - Testes que utilizam os colágenos do tipo IV e VI, úteis para identificação dos subtipos 2M com mutações no domínio A1, não estão clinicamente disponíveis. (Sharma; Haberichter, 2019)

Testes genéticos - Uso limitado, em vista da natureza altamente polimórfica do gene FVW, que contribuem para uma grande variação de mutações que podem ou não estar associadas à doença. (Abou-Ismael *et al.*, 2023)

FVW:RCo - Possui baixa sensibilidade e alto coeficiente de variação inter e intralaboratorial, além de se apresentar ineficaz diante de portadores que apresentem polimorfismos no domínio A1 do FVW, em especial D1472H, que é capaz de reduzir a ligação da ristocetina ao fator, levando à um falso diagnóstico por apresentar uma redução da atividade do fator *in vitro*, mas não observada *in vivo*. (Fogarty; Doherty; O'Donnell, 2020)

Nos últimos anos, inovações nos métodos diagnósticos laboratoriais da DVW foram desenvolvidas com o objetivo de ultrapassar essas limitações dos testes atuais, particularmente, os qualitativos. (Outida, 2022)

Em relação ao teste quantitativo FVW:Ag realizado frequentemente pela metodologia ELISA, laboratórios vem substituindo pelo método de aglutinação por látex automatizado, visto que ele demonstra uma performance mais rápida e eficiente. (Fogarty; Doherty; O'Donnell, 2020) Porém, a nova técnica não é sensível para níveis baixos de detecção, como ocorre no

ELISA, e também pode indicar falsos positivos na presença de fator reumatóide. (Fogarty; Doherty; O'Donnell, 2020)

Com relação ao método qualitativo da Atividade do cofator de ristocetina (FVW:RCo), responsável por avaliar a agregação plaquetária, pode-se dizer que atualmente técnicas novas promissoras, que eliminaram o uso de plaquetas, e até mesmo, do antibiótico ristocetina, surgiram para substituir este método de maneira eficaz e precisa. (Outida, 2022)

O ensaio de ligação do FVW ao receptor GpIb Recombinante (FVW:GPIbR) é caracterizado por empregar fragmentos recombinantes do receptor plaquetário GpIb α em partículas inertes, eliminando o uso das plaquetas e aumentando a precisão do teste por remover possíveis interferentes. (Outida, 2022) Porém, esta técnica ainda utiliza a ristocetina para indução da ligação. (Outida, 2022)

Em relação ao ensaio de ligação do FVW ao receptor GpIb mutante (FVW:GPIbM), este consiste na utilização de receptores plaquetários GpIb α que apresentam mutações de ganho de função, permitindo uma ligação espontânea do FVW na ausência do indutor Ristocetina. (Sharma; Flood, 2017) Essa técnica é capaz de aumentar a sensibilidade do teste, visto que apresenta um limite de detecção mais baixo que FVW:RCo (2 IU/dL), além de apresentar um coeficiente de variação baixo e capacidade de detectar a doenças mesmo em pacientes que apresentem polimorfismos. (Sharma; Flood, 2017)

Além disso, outro teste que ganhou espaço nos laboratórios de hemostasia nos Estados Unidos (EUA) foi o ensaio de ligação do FVW a anticorpos monoclonais (GPIb:Ab), capazes de se ligar aos epítomos da molécula de VW que se acoplam ao receptor plaquetário GpIb. (Smock, 2023) Esse método demonstrou resultados similares às outras inovações, referente à precisão diagnóstica. (Boender *et al.*, 2018)

De acordo com o estudo realizado por Boender et al. (2018), os novos métodos diagnósticos superaram as limitações do FVW:RCo, no que diz respeito à variabilidade, sensibilidade e precisão diagnóstica. A pesquisa envolveu uma comparação das novas técnicas com a tradicional FVW:RCo, para medir a atividade do FVW em 661 pacientes portadores da doença.

Evidentemente, os novos métodos diagnósticos revelaram um avanço importante na exatidão diagnóstica dos tipos e subtipos da DVW. Eles foram capazes de superar as limitações do principal teste para confirmação da doença, a avaliação da atividade de ligação plaquetária do FVW (FVW:RCo). Em termos de precisão, sensibilidade e diminuição da variabilidade, as inovações diagnósticas transcenderam os métodos atuais. No entanto, a disponibilidade

comercial desses testes é limitada, encontrando-se de forma automatizada somente na Europa, Canadá e EUA. (Outida, 2022)

Desse modo, é de suma importância que diretrizes sejam estabelecidas com o objetivo de aumentar a disponibilização dessas inovações diagnósticas. Assim, será possível aprimorar a acurácia diagnóstica da doença em diversos laboratórios, contribuindo de maneira significativa para as estratégias de intervenções terapêuticas a serem realizadas.

5. CONCLUSÃO

O FVW é uma das glicoproteínas maiores do plasma e possui grande importância no processo de coagulação. Por isso, o estudo e diagnóstico correto da DVW é relevante para impedir a progressão da doença. A grande variabilidade de manifestações clínicas, complexidade da fisiopatologia e diferentes classificações são particularidades que contribuem para que o seu diagnóstico seja um processo complexo e desafiador. Para isso, é de suma importância que seja realizada uma análise detalhada da clínica do paciente em combinação aos achados laboratoriais.

A pesquisa laboratorial é fundamentada na divisão dos exames em: testes de triagem, testes confirmatórios e testes especiais. Porém, os testes atuais apresentam significantes limitações, que afetam a acurácia diagnóstica, além do conhecimento insuficiente por parte dos profissionais e heterogeneidade da doença também serem fatores limitantes na precisão do rastreio da condição.

Em vista disso, inovações diagnósticas surgiram nas últimas décadas com o princípio de superar as limitações dos testes atuais, e promover um diagnóstico mais exato e adequado, mas ainda apresentam distribuição limitada aos países desenvolvidos.

Em conclusão, torna-se relevante a promoção de conhecimento sobre os diferentes tipos da doença para os profissionais e população em geral, além do estabelecimento de estratégias que promovam uma ampla disponibilização das novas metodologias nos diferentes laboratórios de hematologia, para permitir um diagnóstico da DVW mais seguro e apropriado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LEEBEEK, F. W. G.; EIKENBOOM, J. C. J. Von Willebrand's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 21, p. 2067–2080, 2016.

SEIDIZADEH, O.; EIKENBOOM J.; DENIS C.; FLOOD V.; JAMES P.; LENTING P.; BARONCIANI L.; O'DONNELL J.; LILLICRAP D.; PEYVANDI F. von Willebrand disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, p. 51, 2024.

REZENDE, B. M.; FIGUEIREDO, A. M. Diagnóstico Laboratorial da Doença de Von Willebrand: Uma revisão de literatura. **Salusvita**, Bauru, v. 40, n.2, p. 123-135, 2021.

ABOU-ISMAIL M.; JAMES P.; FLOOD V.; CONNELL N. Beyond the guidelines: how we approach challenging scenarios in the diagnosis and management of von Willebrand disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 21, n. 2, p. 204–214, 1 fev. 2023.

LORENZI, Therezinha F. **Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2006. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-1998-8/>. Acesso em: 24 set. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de diagnóstico e tratamento da doença de von Willebrand**. Brasília, DF, 2008.

OUTIDA, Juliana E. Avanços diagnósticos na Doença de von Willebrand. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2022. Disponível em: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/plaquetas_coagulopatias/coagulopatias/Avam%C3%A7os%20diagn%C3%B3sticos%20na%20doen%C3%A7a%20de%20von%20Willebrand-Juliana%20Eiko%20Outida.pdf. Acesso em: 27 out. 2024.

O'SULLIVAN J.; TOOTOONCHIAN E.; ZIEMELE B.; MAKKRIS M.; FEDERICI A.; KHAYAT DJAMBAS C.; EL EKIABY M.; ROTELLINI D.; SIDONIO R.; IORIO A.; COFFIN D.; PIERCE G.; STONEBRAKER J.; JAMES PLAVIN M. Von Willebrand Disease: Gaining a global perspective. **Haemophilia**, v. 29, n. 4, p. 1104–1112, 22 maio 2023.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia de Hoffbrand**. 7. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2018. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788582714515/>. Acesso em: 14 out. 2024.

ROBERTS, J. C.; FLOOD, V. H. Laboratory Diagnosis of Von Willebrand Disease. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, n. 1, p. 11–17, maio 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias**. Brasília, DF, 2010.

NG, C.; MOTTO, D. G.; DI PAOLA, J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. **Blood**, v. 125, n. 13, p. 2029-2037, 2015.

LOPES G.; MAPPA L.; PERDIGÃO R.; DE ABREU A.; VELLOSO M. Doença de Von Willebrand: entendendo e enfrentando os desafios hematológicos. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 1, p. 2505–2518, 24 jan. 2024.

BARONCIANI, L.; PEYVANDI, F. How we make an accurate diagnosis of von Willebrand disease. **Thrombosis Research**, v. 196, p. 579-589, 1 dez. 2020.

SHARMA, R.; HABERICHTER, S. L. New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. **Hematology**, v. 2019, n. 1, p. 596–600, 6 dez. 2019.

SHARMA, R.; FLOOD, V. H. Advances in the diagnosis and treatment of Von Willebrand disease. **Blood**, v. 130, n. 22, p. 2386–2391, 30 nov. 2017.

FOGARTY, H.; DOHERTY, D.; O'DONNELL, J. S. New developments in von Willebrand disease. **British Journal of Haematology**, v. 191, n. 3, p. 329–339, 12 maio 2020.

BOENDER J.; EIKENBOOM J.; VAN DER BOM J.; MEIJER K.; DE MERIS J.; FIJNVANDRAAT K.; CNOSSEN M.; LAROS-VAN GORKOM B.; VAN HEERDE W.; MAUSER-BUNSCHOTEN E.; DE MAAT M.; LEEBEEK F. Clinically relevant differences between assays for von Willebrand factor activity. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 16, n. 12, p. 2413–2424, 1 dez 2018.

SMOCK, K. J. Von Willebrand factor testing ratios in the diagnosis and subtyping of von Willebrand disease. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 45, n. S2, p. 23–29, 7 maio 2023.