

ADAMTS-13: diagnóstico de laboratorio

ADAMTS-13: laboratory diagnosis

Lencinas G; Perés S; Aranda F; de Larrañaga G

Hospital de Infecciosas "Francisco Javier Muñiz"
Laboratorio de Hemostasia y Trombosis

giselalencinas@yahoo.com.ar

Fecha recepción: 10/3/2020

Fecha aprobación: 31/3/2020



LABORATORIO

HEMATOLOGÍA
Volumen 24 n° 1: xx-xx
Enero - Abril 2020

Palabras claves: ADAMTS-13,
Púrpura Trombocitopénica Trombótica,
Diagnóstico.

Keywords: ADAMTS-13,
Thrombotic Thrombocytopenic Purpura,
Diagnostic.

Introducción

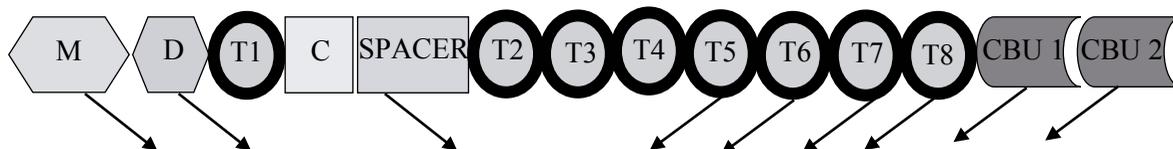
ADAMTS-13 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats, member 13) es una desintegrina y metaloproteasa, zinc y calcio dependiente, codificada en el cromosoma humano 9q34 (Figura 1). Es sintetizada principalmente en las células estrelladas del hígado (90%) y, en menor medida, en endotelio, riñón (células tubulares y podocitos), placenta y plaquetas. Tiene una vida media de 2 a 3 días, se libera como enzima activa a la circulación y, hasta el momento, no se han descrito inhibidores fisiológicos⁽¹⁾.

Las células endoteliales sintetizan el factor de von Willebrand (VWF) y lo liberan a la circulación principalmente como multímeros ultra grandes (UL-VWF). El rol primario de ADAMTS-13 es clivar estos ULVWF, originando las diferentes formas moleculares del VWF que van desde dímeros simples a multímeros más complejos de hasta 20 unidades. El sitio específico de clivaje de ADAMTS-13 se encuentra ubicado en la posición Tyr1605-Met1606

del dominio A2 del monómero de VWF. Este sitio se despliega, volviéndose accesible a ADAMTS-13 cuando la molécula es sometida a altas fuerzas de cizallamiento (*shear stress*) (Figura 2). Esta degradación proteolítica de los ULVWF es un evento fisiológico necesario, ya que éstos tienen un potencial trombogénico elevado⁽¹⁾.

Cuando la actividad de ADAMTS-13 está disminuida, como ocurre en la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), los ULVWF persisten en circulación, se unen a las plaquetas a través del complejo glucoproteico GPIb-V-IX, promoviendo su agregación y la consecuente formación de microtrombos ricos en plaquetas y VWF que, al desprenderse, provocan patología micro/macrovascular oclusiva con isquemia tisular⁽⁴⁾.

Como las características clínicas de PTT son similares a otras entidades clínicas que se agrupan dentro de las microangiopatías trombóticas (MAT), la determinación de la actividad de ADAMTS-13 resulta una herramienta muy útil para ayudar al diagnósti-



Dominios que contribuyen con la unión al VWF

Figura 1. Representación esquemática de la molécula de ADAMTS-13

La molécula está formado por: 1 dominio de metaloproteasa (M), 1 dominio símil-desintegrina (D), 8 repeticiones de motivos de trombospondina (T1 - T8), 1 dominio rico en cisteína (C), 1 dominio espaciador (SPACER), 2 dominios CBU (CBU1 y CBU2).

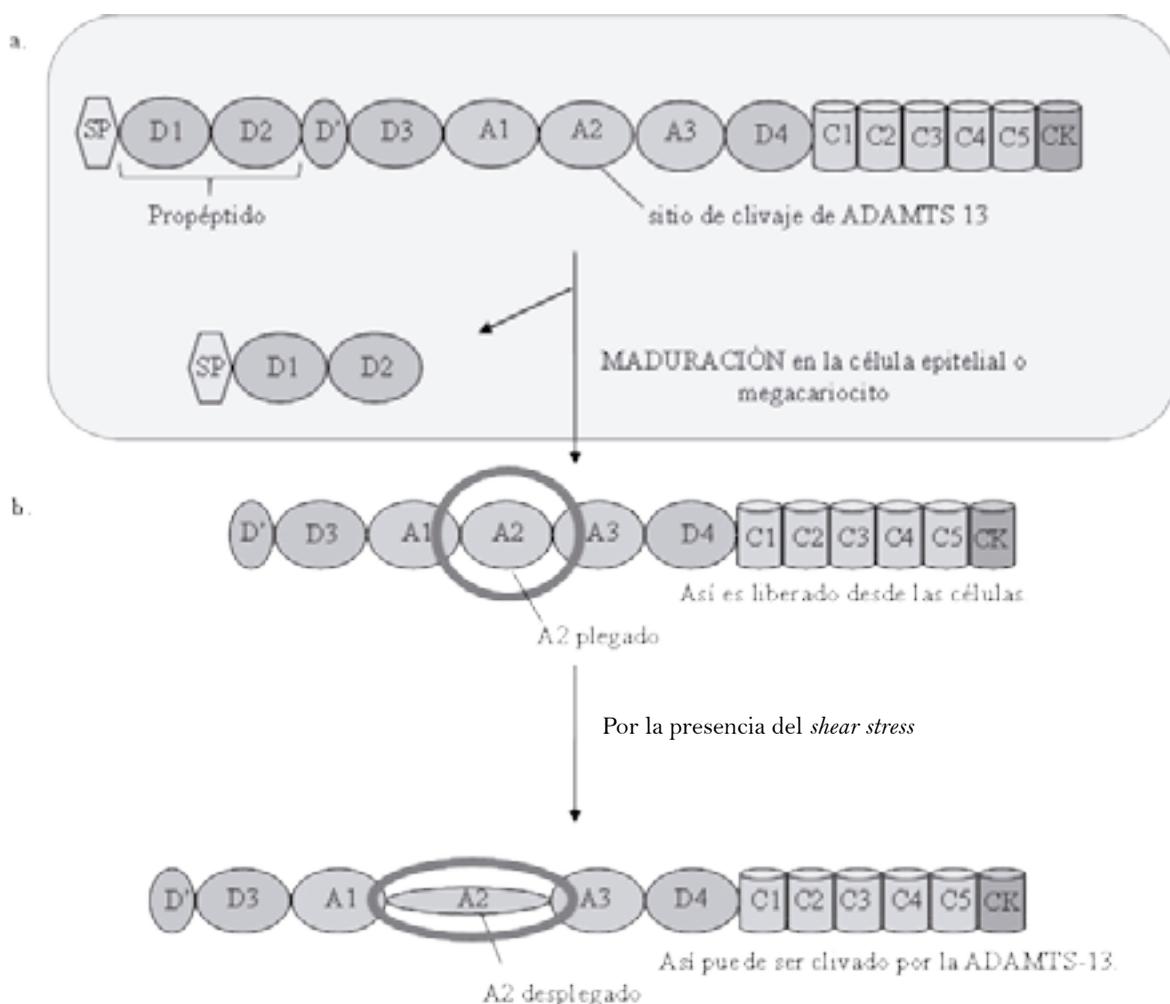


Figura 2. Representación esquemática de la molécula de VWF

a. La molécula de VWF presenta 1 región péptido señal (SP), 5 dominios D (D1, D2, D3, D4, D'), 3 dominios A (A1, A2, A3), 6 dominios C (C1-C6) y 1 dominio CK.

Durante la maduración se elimina el péptido señal y el propéptido.

b. Esquema que representa a la molécula de VWF liberada desde la célula endotelial o plaqueta. En presencia de *shear stress*, el dominio A2 del VWF se despliega y expone los sitios de unión a la ADAMTS-13, lo que provoca finalmente el clivaje del enlace Tyr1605-Met1606 del VWF.

co diferencial, al seguimiento de la enfermedad y a la evaluación o modificación del tratamiento.

Fundamento del ensayo

Los laboratorios especializados pueden determinar tres características relacionadas con ADAMTS13: la actividad, el antígeno y la presencia de anticuerpos. Debido a su valor informativo acerca de la funcionalidad de la molécula, la actividad es el principal parámetro a evaluar.

Determinación de la actividad de ADAMTS-13

Los primeros métodos descritos para determinar la actividad de ADAMTS-13, conocidos como de **primera generación**, consisten en técnicas funcionales basadas en la degradación de la molécula completa de VWF, plasmático o recombinante, por la enzima presente en la muestra de plasma a analizar. Estos ensayos requieren someter al VWF a condiciones que permitan su desplegamiento, facilitando el acceso de la metaloproteasa a su lugar de acción. En presencia de ADAMTS-13, las moléculas de VWF son degradadas y, luego, los productos de digestión son analizados por diferentes métodos: 1- separados por tamaño mediante electroforesis en geles de SDS-agarosa o SDS-poliacrilamida, o 2- por su actividad residual medida a través de su unión al colágeno o mediante el ensayo de agregación plaquetaria inducida por ristocetina. Algunas desventajas que presentan estas metodologías es que requieren mucho tiempo (2-3 días), son dificultosos y presentan mucha variabilidad intra e interensayo.

Actualmente, se utilizan los métodos llamados de **segunda generación**, que utilizan fragmentos específicos de la molécula de VWF (péptidos sintéticos) aumentando la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los ensayos al eliminar la variación debido a la composición multimérica del VWF. Al mismo tiempo, no requieren un tratamiento previo de la muestra para facilitar la acción enzimática de ADAMTS-13. De ellos los más difundidos son los ensayos de inmunoensayo comercial (ELISA) con detección por sustratos cromogénicos, como por ejemplo **TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity** (Technoclone GmbH, Vienna, Austria). Este método utiliza como sustrato un péptido recombinante de fusión GST-VWF73, que contiene el sitio de corte específico de la ADAMTS-13, inmovilizado en una placa sobre la que se añade la muestra de plasma en la que se quiere determinar la actividad de la enzima.

En presencia de ADAMTS-13, este sustrato es clivado, exponiendo una secuencia de aminoácidos específica que se detecta posteriormente con el agregado de un anticuerpo conjugado con enzima peroxidasa y posterior revelado con un sustrato cromogénico (TMB). La intensidad de color resulta directamente proporcional a la actividad de ADAMTS-13.

Otro de los métodos actualmente disponibles son los denominados **FRETS** (*Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay*). En estos ensayos, el fragmento VWF73 es modificado químicamente de manera que contiene un fluoróforo y una molécula que actúa inhibiéndolo. En presencia de ADAMTS-13, ésta clivará el péptido, liberando el inhibidor y permitiendo la emisión de fluorescencia al exponerlo a una cierta longitud de onda. La intensidad de la fluorescencia será directamente proporcional a la actividad de la enzima.

Recientemente ha sido descrito un ensayo llamado **HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay** (Instrumentation Laboratory, Bedford, Massachusetts, United States), que utiliza el péptido VWF73 unido a partículas magnéticas y tecnología de quimioluminiscencia como método de detección.

Determinación de ADAMTS-13 antigénica

También existe la posibilidad de medir la concentración antigénica de ADAMTS-13, mediante la técnica de ELISA. Esto resulta útil para comprobar si las alteraciones congénitas afectan la expresión de la proteína o su actividad funcional.

Estudios complementarios

Para complementar los estudios se pueden determinar:

1. **Anticuerpos anti-ADAMTS-13 totales:** pueden medirse por ELISA, *western blotting* o inmunoprecipitación. Estos anticuerpos son principalmente de isotipo IgG, pero también se han descritos de isotipo IgM e IgA.
2. **Anticuerpos con acción inhibitoria de la actividad de ADAMTS-13:** estos cobran importancia en el diagnóstico de la PTT autoinmune o adquirida. Para detectarlos se realiza una mezcla de plasma de paciente con plasma control (1:1) y posteriormente se determina la actividad de ADAMTS-13 por alguno de los métodos previamente descritos. La capacidad inhibitoria del anticuerpo se expresa en unidades Bethesda (1 unidad Bethesda es la concentración de anticuer-

po capaz de inhibir la actividad ADAMTS-13 en un 50%).

3. **Estudios genéticos de ADAMTS-13:** útiles para la confirmación del diagnóstico de PTT hereditaria. Existen más de 100 mutaciones descritas en el gen de ADAMTS-13, algunas en estado homocigota y otras en estado heterocigota, que están involucradas en la fisiopatología de la PTT⁽¹⁾.

Condiciones preanalíticas para medir la actividad de ADAMTS-13

- **Toma de muestra:** es aconsejable extraer una muestra antes del inicio del tratamiento de plasmaféresis, aún sin tener un diagnóstico certero, para conocer el valor basal de la actividad de ADAMTS-13. En el seguimiento del paciente, la toma de muestra deberá realizarse lo más alejada posible de la plasmaféresis ya que ésta puede provocar que se sobrestimen los niveles de actividad de la enzima.

- **Muestra:** se utiliza muestra de plasma pobre en plaquetas obtenido con citrato de sodio 3.2% (1:9). No puede utilizarse EDTA como anticoagulante, ya que es un inhibidor irreversible de la actividad de ADAMTS-13. Las muestras pueden ser conservadas 2-4 horas a temperatura ambiente o bien guardadas congeladas, preferentemente a una temperatura ≤ -70 °C. Deben descongelarse a 37 °C en el momento de realizar las determinaciones.

- **Interferencias:** hemólisis o lipemia severa o una marcada hiperbilirrubinemia interfieren en las determinaciones pudiendo arrojar falsos valores disminuidos de actividad de ADAMTS-13, particularmente en los ensayos FRETTS. La hemoglobina libre en el plasma de pacientes con hemólisis intravascular puede también inhibir a ADAMTS-13⁽²⁾. La presencia de proteasas, como por ejemplo catepsina G o elastasa, puede hacer que se sobrevaloren los niveles de ADAMTS-13 por proteólisis inespecífica del péptido VWF73.

Condiciones analíticas

Con el objetivo de armonizar los resultados de laboratorio, la Organización Mundial de la Salud en el año 2014 desarrolló el primer estándar internacional (Código 12/252) que es utilizado como patrón primario para validar los calibradores provistos por los kits. Éste es un punto muy importante a evaluar en el momento de la elección del método.

Como control de calidad interno se utiliza el set de

controles provistos por el fabricante (alto y bajo). Se dispone además de controles de calidad externos como el *External Quality Assessment Programme* (EQAP) de la fundación ECAP (Países Bajos).

En los casos del ELISA cromogénico y de FRETTS, se realiza una curva de calibración en cada corrida. Son técnicas manuales que requieren personal entrenado y demandan aproximadamente 3,5 horas en el caso del ELISA cromogénico y 1 hora en el caso de FRETTS. Los límites de detección son de 0,2-0,5 % y 3-6 % de actividad de ADAMTS-13, respectivamente. FRETTS tiene como desventaja que requiere de un espectrofluorómetro y un programa informático específico.

Con respecto al HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay, es una técnica muy prometedora, ya que es altamente sensible y específica, totalmente automatizada, que requiere sólo 33 minutos para un resultado pero necesita de un autoanalizador específico: ACL AcuStar™ (Instrumentation Laboratory) que no está actualmente disponible en todos los países. Además necesita más estudios de validación contra los métodos de referencia. En este caso, el límite de detección es de 0,2-0,5 % de actividad de ADAMTS-13.

Tanto el ensayo cromogénico, como el FRETTS y el HemosIL AcuStar presentan una alta concordancia para detectar valores menores al 10 % de actividad de ADAMTS-13, que es el valor de corte definido internacionalmente para diagnosticar deficiencia severa de ADAMTS-13. Sin embargo para valores superiores se observan algunas discrepancias⁽³⁾.

En todos los ensayos, los resultados pueden ser expresados como porcentaje o como actividad de ADAMTS-13 (IU/ml).

Valores de referencia

Los valores de referencia para la actividad de ADAMTS-13 son muy variables y dependen del método utilizado y de la población en estudio, por lo cual se recomienda que cada laboratorio determine su propio rango de referencia.

Se considera normal un valor de actividad de ADAMTS-13 mayor a 40-50 % y se ha observado en general que los valores poblacionales oscilan en el rango de 90-110 %⁽⁴⁾.

Utilidad clínica

La principal utilidad de la medición de la actividad

de ADAMTS-13 es para el **diagnóstico diferencial de las MAT.**

Las MAT son un conjunto de entidades que se caracterizan por la presentación de anemia hemolítica microangiopática, con presencia de esquistocitos en el frotis de sangre periférica, presencia de marcadores característicos de hemólisis (elevación de reticulocitos, lactato deshidrogenasa [LDH] y bilirrubina indirecta y disminución o ausencia de haptoglobina, entre otros) y trombocitopenia de intensidad variable. Para el diagnóstico diferencial, la historia clínica del paciente juega un rol importante. Pueden diferenciarse en primarias y secundarias (Cuadro 1).

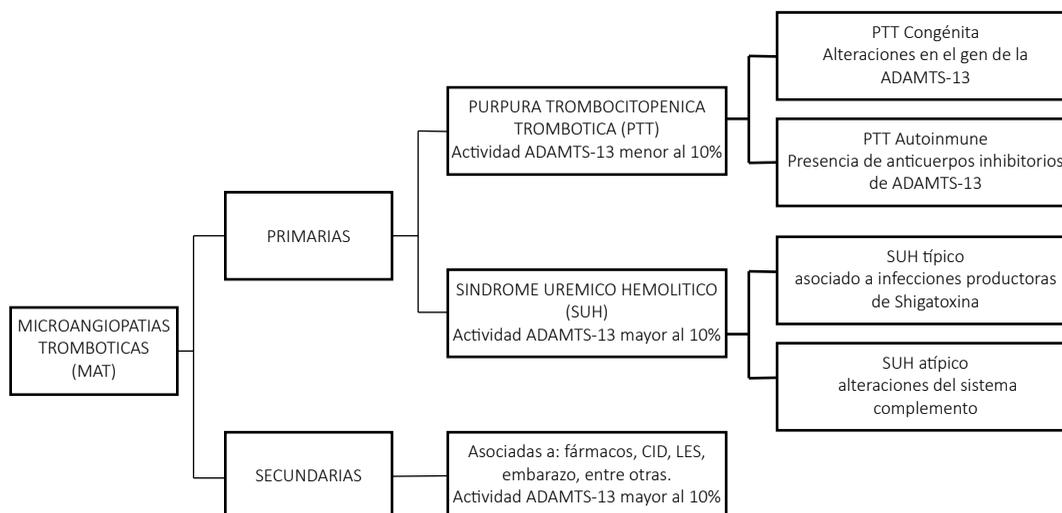
Tanto las **PTT adquiridas como congénitas** se presentan con deficiencias severas en la actividad de ADAMTS-13, por lo general menor al 10%, y se consideran una emergencia médica, ya que la mortalidad a las 24 horas alcanza un 90% si el paciente no es tratado, mientras que con el tratamiento ésta disminuye al 10-20%. Es por esta razón que, ante la sospecha de esta patología basándose en la historia clínica, el examen del paciente y el frotis de sangre periférica, se comienza con tratamiento empírico de plasmaféresis inmediatamente, aún sin contar con el valor de actividad de ADAMTS-13. Consecuentemente, la **utilidad clínica de la determinación de la actividad de ADAMTS-13 para diagnóstico de la enfermedad** en la urgencia médica es limitada, y esto es debido a que no se disponen de métodos de laboratorio que sean los suficientemente rápidos para

ayudar en ese momento. Aun así, la toma de muestra, previo a la plasmaféresis en el tratamiento empírico, es de utilidad, porque ayuda al diagnóstico diferencial de las MAT y esto es beneficioso porque permite optar por el tratamiento más adecuado en cada caso. A su vez, la determinación de la actividad de la metaloproteasa resulta **útil durante el seguimiento del paciente en el tratamiento y en los períodos de remisión de la enfermedad**, ya que es un buen indicador de riesgo de recaídas y recurrencias, adelantándose a la clínica del paciente.

En otras MAT, como en el caso del síndrome urémico hemolítico (SUH), tanto típico como atípico, si bien se observa una disminución de ADAMTS-13, estos valores se encuentran por encima del 10%. De igual manera, las MAT secundarias asociadas a distintas condiciones clínicas como enfermedad hepática, estados inflamatorios agudos, coagulación intravascular diseminada, síndrome antifosfolipídico catastrófico, consumo de determinados fármacos, enfermedades del tejido conectivo, preeclampsia, infección por VIH, neoplasias y embarazo, entre otras, se presentan con niveles normales o disminuidos de actividad de la metaloproteasa, variables según la patología asociada, pero mayores al 10%.

Por todo lo mencionado, la búsqueda de nuevos métodos rápidos y sensibles que ayuden en el diagnóstico temprano de estas patologías es uno de los objetivos primordiales para poder aplicar el tratamiento más adecuado para cada una de ellas.

Cuadro 1. Clasificación de las microangiopatías trombóticas



Conflictos de interés: Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Kremer Hovinga JA, Coppo P, Lammle B, Moake JL, Miyata T, Vanhoorelbeke K. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17020.
2. Scully M, Cataland S, Coppo P et al. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost*. 2017;15:312-22.
3. Valsecchi C, Mirabet M, Mancini I et al. Evaluation of a New, Rapid, Fully Automated Assay for the Measurement of ADAMTS13 Activity. *Thromb Haemost*. 2019;119:1767-72.
4. Contreras E, de la Rubia J, Del Rio-Garma J et al. [Diagnostic and therapeutic guidelines of thrombotic microangiopathies of the Spanish Apheresis Group]. *Med Clin (Barc)*. 2015;144:331 e1- e13.



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.