

Trombostenia de Glanzmann:

Revisão teórica a propósito de um caso clínico.

Nome do aluno: Maria da Paz Morais Varela de Brito

Nome do orientador: Maria João Parale

Hospital de Santa Maria

Serviço de Pediatria

Unidade de hematologia pediátrica

2014/2015

6º Ano

Abstract

A trombastenia de Glanzmann (TG) é um distúrbio plaquetário hereditário raro de transmissão autossômica recessiva. É caracterizado pela ausência ou disfunção do complexo $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, responsável pela agregação das plaquetas activas através da ligação a proteínas adesivas como o fibrinogénio. Os avanços da biologia molecular permitiram identificar mais de 150 mutações nos genes αIIb e β3 responsáveis pela doença. São descritos 3 tipos de TG. As hemorragias mucocutâneas são principal problema clínico apresentado em crianças com menos de 10 anos. A abordagem terapêutica em caso de hemorragia grave ou pré intervenção cirúrgica é conseguido através de transfusões plaquetárias e/ou factor VII recombinante activado. Neste artigo apresentamos o caso clínico de uma criança do sexo feminino de 15 meses, nascida de pais não consanguíneos, com uma história de episódios de discrasia hemorrágica mucocutânea manifestada por equimoses e petéquias, desde os 3 meses de idade e cuja a investigação diagnóstica permitiu atribuir como possível causa patológica a trombastenia de Glanzmann.

Thrombasthenia of Glanzmann (TG) is a rare autosomal recessive inherited platelet disorder. Is characterized by a deficiency or functional defect of platelet $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ complex, which mediates aggregation of activated platelets by binding the adhesive proteins, like fibrinogen. Advances in molecular biology have permitted to precise more than 150 mutations on αIIb or β3 genes responsible for the disease. Three types of TG are described. Mucocutaneous hemorrhages are the main clinical problem, present in children before the age of 10 years. Therapeutic management in case of severe bleeding or for preparing surgical intervention is done with platelet transfusions and/or recombinant activated factor VII. In this article, we present a female child with 15 months old, born from non-consanguineous parents, with several episodes of mucocutaneous hemorrhages manifested by equimoses and petechiae, since its 3 months old and whose clinical research allowed to assign as possible pathological cause the disease thrombasthenia of Glanzmann.

Introdução

A trombostenia de Glanzmann (TG) foi descrita pela primeira vez em 1918 em Bern, pelo Dr. Eduard Glanzmann que lhe deu o nome de “trombostenia hereditária hemorrágica”. As crianças por ele observadas, na sua maioria naturais de uma pequena vila chamada de *Le Valais*, situada nos Alpes suíço e na qual o casamento consanguíneo era muito frequente. Foi descrita como uma nova púrpura na qual o número de plaquetas dos doentes afectados encontrava-se normal, a retracção do coagulo ausente ou anormalmente diminuída e o tempo de sangramento prolongado.[1] Insere-se no grupo das patologias plaquetárias hereditárias, é rara, ocorre de forma autossómica recessiva. Ocorre como consequência de mutações nos genes ITGB2B e ITGB3, localizados num mesmo segmento do q21.32 do cromossoma 17 e cuja a expressão alterada resulta na ausência de síntese ou na disfunção da integrina α IIb β 3 (também conhecida com a glicoproteína IIb/IIIa). Como todas as integrinas, a α IIb β 3 é um heterodímero, composto por duas subunidades, uma α e outra β , unidas de forma não covalente e constituídas por segmentos extracelulares, transmembranares e intracelulares (fig. 1).

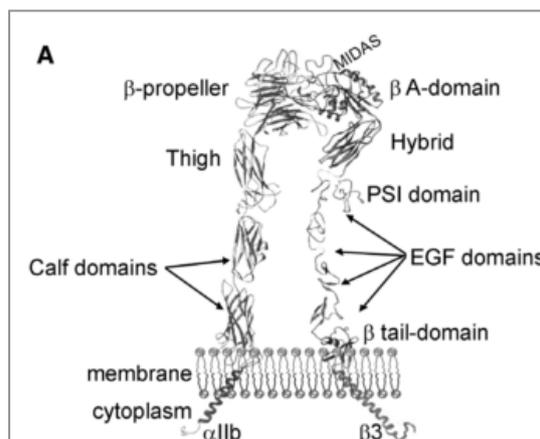


Figura1: A: Organização da integrina α IIb β 3, subunidade α e β e seus domínios extracelular, transcelular e intracelular. (Susan S. Plow, Edward F. Integrin α IIb β 3: From discovery to efficacious therapeutic target. *Circulation Research*. 2013. 112. 1189-1200)

Pela sua estrutura e arranjo molecular, a integrina α IIb β 3 liga-se quer a ligandos da matriz extracelular (como o fibrinogénio) quer a ligandos da matriz intracelular (como o citoesqueleto). Para além da sua função fundamental na adesão e agregação plaquetar, funciona também como um canal bidireccional, condutor de informação entre o meio intra e extra celular[2][3][4].

É o receptor extracelular mais abundante à superfície da membrana plaquetária, com mais de 50.000 copias por plaqueta. A ausência ou diminuição da sua actividade, nomeadamente a ligação ao fibrinogénio, interfere de forma significativa na hemoestasia primária e como tal, defeitos na integrina α IIb β 3

exprimem-se clinicamente sob a forma de discrasia hemorrágica [3].

O diagnóstico é habitualmente realizado na infância, em crianças que apresentam um quadro de hemorragias mucocutâneas, como púrpura, epistáxis, menorragias e gengivorragias de gravidade variável.

O diagnóstico e classificação desta patologia, perante um alto nível de suspeição, são baseados na avaliação de quatro aspectos: história clínica (história familiar, gravidade e frequência de sintomas hemorrágicos; outras doenças associadas); avaliação da função plaquetária (agregação plaquetar em resposta a agentes fisiológicos como o ADP, colagénio, epinefrina, trombina e ristocetina; reacção de retracção do coagulo; tempo de hemorragia e PFA-100); avaliação integrina α IIb β 3 plaquetária (citometria de fluxo) e análise genética (PCR do DNA plaquetário e sequenciação dos domínios e locais de “*splice*” dos genes ITGB2B e ITGB3) [3] [5].

Epidemiologia

É a trombocitopatia hereditária mais comum e a mais estudada, contudo, a sua incidência estimada é de 1/1000.000 a nível mundial. Existe um ligeiro predomínio no sexo feminino (58% vs

42%). É mais comum na Europa e médio oriente, que nos EUA. São conhecidos grupos étnicos, nos quais a consanguinidade é recorrente, como os Judeus Iraquianos, Árabes Palestínianos, Árabes da Jordânia, na comunidade cigana francesa e hindus do sul da Índia. [2][3][6].

Em Portugal a incidência da TG é desconhecida. No hospital Santa Maria são conhecidos e acompanhados três casos e no centro de estudo hematológicos em Coimbra, apenas dois.

Classificação

Esta patologia é classificada em três categorias, sendo que em todas a agregação plaquetar não se realiza. Esta classificação baseia-se nas presença de diferentes percentagens do complexo α IIb β 3, na presença ou ausência de fibrinogénio intraplaquetário e na qualidade da reacção de retracção do coagulo. Deste modo organiza-se em:

- Tipo I, forma grave, com menos de 5% do normal do complexo α IIb β 3, ausência de fibrinogénio intraplaquetário e ausência de reacção de retracção do coagulo;
- Tipo II A, com 5 a 10% do normal de complexo α IIb β 3, presença de fibrinogénio intraplaquetário e

atraso na reacção de retracção do coagulo

- Tipo IIB, forma variante, com 50 a 100% do normal do complexo α IIb β 3 contudo estruturalmente disfuncional, presença de fibrinogénio intraplaquetário e reacção de retracção do coagulo variável. [1] [3]

Fisiopatologia

Em plaquetas não activadas o complexo α IIb β 3 encontra-se num estado de baixa afinidade estrutural que não lhe permite a ligação a moléculas de adesão extracelulares e de alto peso molecular, como o fibrinogénio plasmático. Assim, a adesão e a activação plaquetária provocada pela estimulação dos agonistas naturais da agregação (ADP, trombina, colagénio e epinefrina) e a sua interacção com os respectivos receptores, inicia uma transição do complexo α IIb β 3 de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade, ficando este activo.

A activação do complexo α IIb β 3 ocorre de forma muito rápida e está também dependente do sucesso de uma série de vias sinalização metabólicas intracelulares, activadas pela estimulação dos receptores dos agonistas naturais da agregação. Estas vias resultam:

(1) no aumento da concentração intracitoplasmática de cálcio; (2) na fosforilação, mediada por uma proteína cinase C, de uma serina e treonina presente na porção intracitoplasmática da subunidade β 3 e (3) na ligação de proteínas do citoesqueleto (talina e kindlina-3) ao terminal citoplasmático da subunidade β 3. [18] Tais alterações são transmitidas através do domínio transmembranar do complexo α IIb β 3 ao domínio extracelular, e resultam no rearranjo estrutural com exibição de um “centro de ligação ao ligando”, permitindo a interacção com o fibrinogénio. É através de sequencias RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que o fibrinogénio interage com a subunidade β 3 e através de um dodecapeptido localizado na porção COOH da sua cadeia α com a subunidade α IIb. (fig. 2)

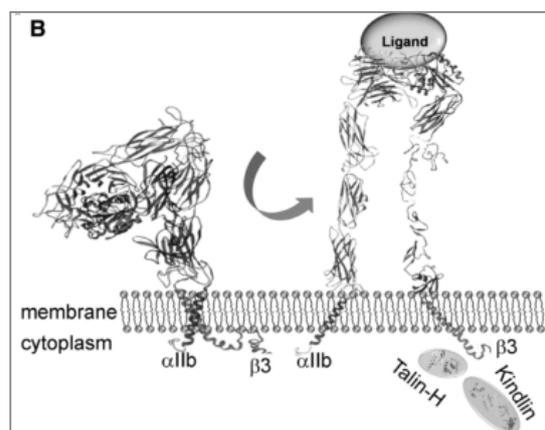


Figura 2: Transição do complexo α IIb β 3 de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade, ficando este activo.

(Susan S. Plow, Edward F. Integrin α IIb β 3: From discovery to efficacious therapeutic target. *Circulation Research*. 2013. 112. 1189-1200)

Outras moléculas adesivas, como a o factor de von Willebrand, fibronectina ou vitronectina, através da sua sequencia RGD também se podem ligar ao complexo α I**II** β 3, embora com menos afinidade que o fibrinogénio. [1] [2] [5]

São as pontes inter-plaquetárias formadas pela ligação complexo α I**II** β 3-fibrinogénio e o cálcio extra celular, que tornam possível a formação de um trombo plaquetário. A consolidação deste agregado é atingindo à custa de vários mecanismos, entre os quais: (1) Multiplicidade de locais de ligação ao complexo α I**II** β 3 numa mesma molécula de fibrinogénio; (2) “*clusterization*” pós ligação com ligando dos receptores α I**II** β 3; (3) ligação da tromboespondina, molécula adesiva libertada pelos grânulos α , ao agregado plaquetario; (4) amplificação da activação plaquetária pós ligação com ligando, por uma via de sinalização “*outside in*”. [1] É de referir ainda que o fibrinogénio, como anteriormente constatado, é essencial para agregação plaquetar, não tem apenas origem plasmática, mas também intraplaquetária, sendo libertado pelos grânulos α pós activação plaquetária, ligando-se ao complexo α I**II** β 3, também presente nestes grânulos, e segregado até à superfície plaquetária. [1]

A importância do complexo α I**II** β 3 nos processos de coagulação não se restringe apenas à sua participação primordial na agregação plaquetar e na hemostase primária, pois participa também na hemostase secundária. A protrombina também é ligando da integrina α I**II** β 3 e esta ligação facilita o “*cleavage*” da protrombina pelo factor Xa, amplificando deste modo, a quantidade e rapidez de formação da trombina, e deste modo activa a cascata da coagulação. Adicionalmente a fibrina também se liga a este complexo, levando ao fenómeno de retracção do coágulo plaquetário, que contribui para uma maior estabilidade do mesmo. [1]

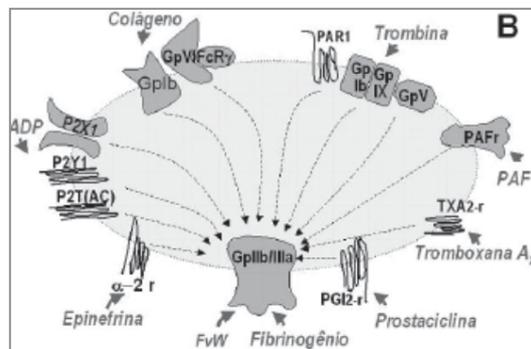


Figura 3:Agentes fisiológicos agonistas da activação/agregação plaquetária – ADP, Colagénio, Trombina, Epinefrina. (Susan S. Plow, Edward F. Integrin α I**II** β 3: From discovery to efficacious therapeutic target. Circulation Research. 2013. 112. 1189-1200)

Como se torna evidente pela descrição acima feita, a ausência quantitativa ou a disfunção qualitativa da integrina α I**II** β 3 levará à impossibilidade das plaquetas se ligarem ao fibrinogénio e logo à ausência da agregação plaquetar pós estímulo por

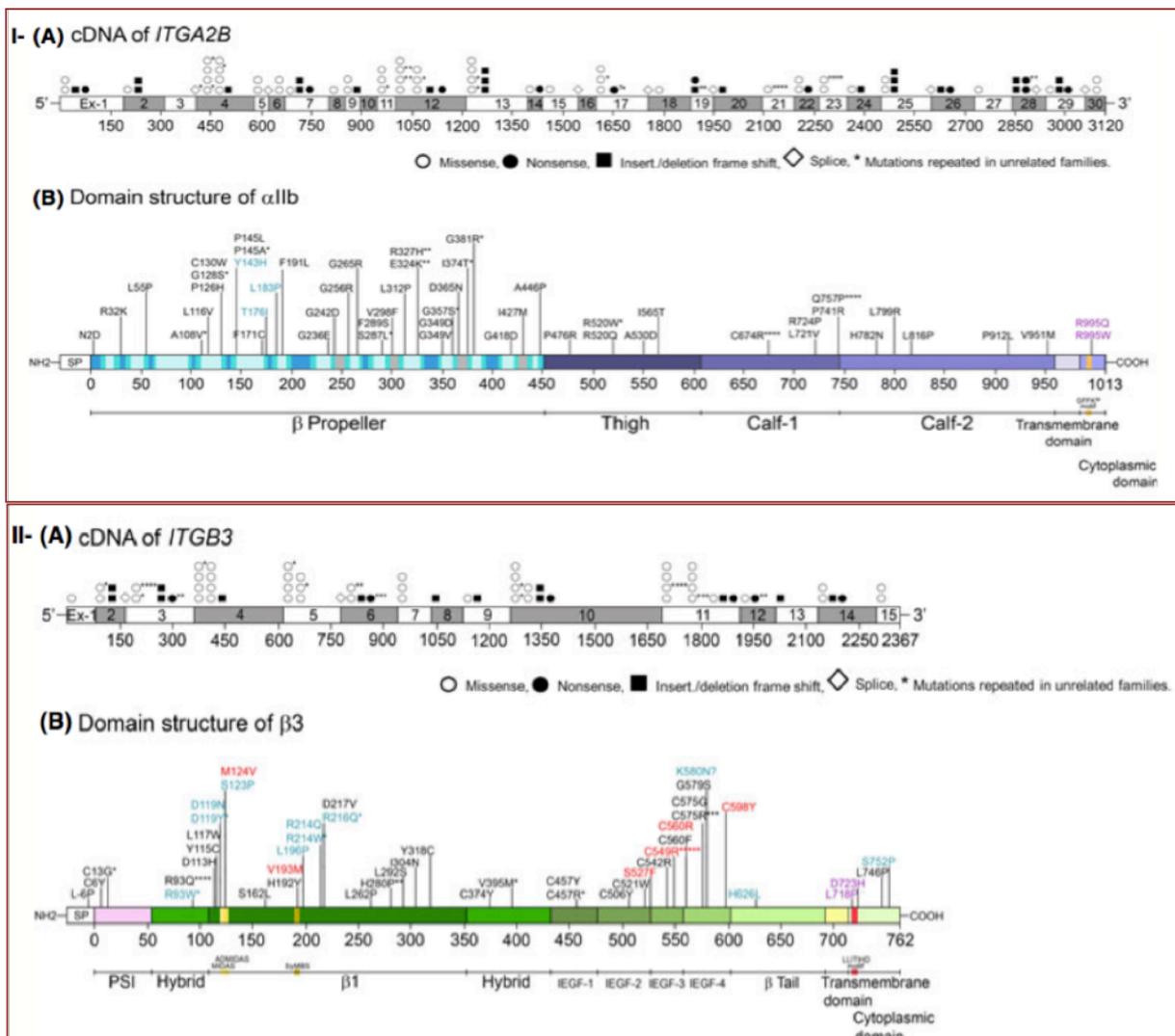
agonistas fisiológicos e por vezes à ausência de retracção de um coagulo de fibrina. No seu conjunto, a ausência destes fenómenos justifica o carácter hemorrágico característico desta patologia.

Bases genéticas

Mais de 150 mutações que originam TG nos genes *ITGA2B* (que codifica a subunidade α IIb) e *ITGB3* (que codifica a subunidade β 3) foram já identificadas (Fig. 3), existindo um largo espectro de defeitos, que incluem:

(1) substituições de um único nucleótico, originando mutações pontuais sem sentido ou com perda de sentido; (2) defeitos no *splicing*; (3) pequenas deleções, inserções e inversões. Deleções grandes são raras[3].

Figura 4: Representação Esquemática dos genes *ITGA2B(I)* e do gene *ITGB3 (II)* que ilustra a ampla gama de mutações que dão origem à tromboestenia de Glanzmann. (Nurden, Alan T. Nurden, Paquita; Congenital platelet disorders and understanding of platelet function; British Journal of Haematology; 2014. 165. 165-178.)



de mutações, apesar do seu menor “spanning” de 17kb, possivelmente pelo maior número de exões – 30 comparado com 15 do gene ITGB3 com “spanning” 46kb (o que resultará numa maior densidade de área codificante) [6].

A maioria das mutações com perda de sentido, são mutações pontuais de substituição de único nucleótido que resultam na tradução de um novo aminoácido. Estas impedem a biossíntese de uma das subunidades nos megacariócitos ou inibem o transporte do complexo pró- α IIb β 3 do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi e/ou a sua exportação até à membrana celular, levando à ausência da formação do complexo α IIb β 3 ou ao aumento da sua degradação intracelular, conduzindo ao défice quantitativo desta integrina. Mutações sem sentido, que na sua maioria afectam o gene ITGB3, com substituições pontuais de único nucleotido cuja a tradução resulta na formação de “codão” stop e que atingem os domínios de ligação ao fibrinogénio, conduzem à expressão da integrina α IIb β 3 não funcional, conduzindo ao défice qualitativo desta integrina.[4]

Dado o elevado número de mutações descritas, é esperado um baixo número de homozigóticos, sendo a maioria dos doentes heterozigóticos. Estes apresentam

metade da concentração normal do complexo α IIb β 3, com função plaquetária mantida e logo, sem manifestações clínicas.

A correlação entre genótipo e fenótipo é débil, pois doentes com o mesmo genótipo podem apresentar fenótipos diversos, caracterizados por graus de gravidade da hemorragia diferentes. Tal observação implica a necessidade de estudos correlacionais adicionais entre factores de risco e polimorfismos genéticos dos genes que expressam e regulam os agentes relacionados com a hemostase sanguínea: subpopulações plaquetárias, receptores plaquetários, factores de coagulação e células endoteliais vasculares. Foi já investigado o possível efeito protector de defeitos pró-trombóticos simultâneos, como o factor V de Leiden ou mutações no gene da protrombina, na gravidade da hemorragia, no entanto sem resultados conclusivos .[4] Em estudo estão os polimorfismos de um único nucleótido que diminuem o risco de hemorragia grave (através da promoção da formação de fibrina ou os que promovem uma grande densidade do receptor do colagénio α 2b1) [3] [6] [7]. [8].

Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas na tromboestenia de Glanzmann normalmente iniciam-se durante a infância (em média a idade do diagnóstico é aos 10 anos), tendem a diminuir de frequência e gravidade com o tempo e apresentam uma ampla e imprevisível apresentação, em relação à sua gravidade, manifestando-se desde uma aparente tendência para equimoses fáceis à hemorragia grave a potencialmente fatal. [4][9][10].

A hemorragia cutânea do tipo púrpura é muito comum e pode ser detectada até no período neonatal, bem como petéquias e hemorragias subconjuntivais (devido ao choro). Os sintomas hemorrágicos de apresentação mais frequentes são: tempo de hemorragia prolongado pós trauma mínimo, epistaxis (75%), sangramento das gengivas (63%), equimoses fáceis (61,8%) e menorragias (98%) durante a menarca. Hemorragias gastrointestinais (10-25%) são pouco comuns e normalmente graves. [11].

- A púrpura: surge em áreas de pressão ou de exposição micro-traumática, raramente é espontânea;
- As gengivorragias, favorecidas pela má higiene oral, é a manifestação mais comum na idade

adulta, e pode ser responsável por anemia ferropénica;

- As hemorragias gastrointestinais, podem em alguns casos resultar de angiodisplasias locais ou difusas e são manifestações particularmente importantes.
- A hemorragia intracraniana (pós trauma ou parto) e hematomas viscerais, são manifestações excepcionais.
- A hematúria, bem como hemartroses, que podem ocorrer pós trauma da articulação femerotibiopatelar, são sintomas raros.
- A Hemorragia pós trauma e procedimentos invasivos (cirúrgicos, extracção dentária, circuncisão) pode ser grave.
- A gravidez e o parto, representam uma condição particularmente propensa a hemorragias graves em mulheres tromboesténicas. [1].

Segundo um estudo de *M.Borhany*, publicado em 2012, em pacientes com TG a necessidade média de recorrer ao hospital por diferentes tipos de hemorragias, num período de 3 anos, foi a de 12 vezes. Neste mesmo estudo, em 173 episódios hemorrágicos, 147 (85%) necessitaram de internamento hospitalar.

O motivo mais comum para internamento hospital foi o de hemorragia por epistaxis, com tempo médio de internamento de 4 dias. [12] [13]. Em relação a esta ultima manifestação, a epistaxis, num estudo realizado por *R.Raul Rosas* [14] também é o motivo hemorrágico pelo qual estas crianças mais recorrem ao hospital, sendo que 84% dessas visitas necessitam de internamento, nomeadamente da unidade de cuidados intensivos (43%).

A mortalidade associada a hemorragia na TG é a 1 a 15 % (maior risco associado a gravidez e parto)[3].

Riscos associados à TG:

- Anemia ferropénica por perda sanguínea, frequente com gengivorragias.
- Trombose venosa profunda: ocorre quando associada ao factor V de Leiden, transfusão de plaquetas e tratamento com FVIIa. A ausência de agregação plaquetar não protege as pessoas com GT de eventos trombóticos. [7].
- Hemotórax espontâneo[11].

Meios Complementares de

Diagnóstico:

- Hemograma completo e observação de esfregaço de sangue periférico. Este último como meio de confirmar a contagem plaquetária e visualização do tamanho e morfologia das mesmas, bem como das restantes linhagens de células sanguíneas.

- Parâmetros da coagulação para despiste de coagulopatias: PT, aPTT, fibrinogénio e componentes da doença de Von Willebrand.

- “*Platelet function analyser – 100*”, PFA-100: sistema que analisa a função plaquetaria. Uma amostra de sangue total, tratado com citrato, é colocada num tubo que contem no interior uma membrana revestida de colagénio e epinefrina ou colagénio e ADP. O sangue é aspirado e forçado a correr num sentido único (simulando a corrente sanguínea) através de uma abertura da mesma membrana. O PFA-100 contabiliza o tempo que a amostra demora a formar um coagulo plaquetário na abertura da membrana. O valor normal é de 100s.

- Agregometria de transmissão óptica (“*Light transmission aggregometry*”), : Nesta técnica o sangue é centrifugado a força suficientemente baixa para se obter

plasma rico em plaquetas. O plasma resultante é agitado numa cuvete a 37 °C, entre uma fonte de luz e uma célula fotoelétrica de medição. De acordo com esta metodologia, as plaquetas são expostas a agentes agregantes, tais como: o ADP, epinefrina, colagénio, ácido araquidónico ou péptido activador do receptor da trombina (TRAP), ristocetina (antibiótico que estimula a agregação plaquetária por aumento da ligação do FvW à glicoproteína Ib). O agregado de plaquetas resultante aumenta a transmissão de luz, que é detectada e registada em função do tempo, após adição do reagente. Quanto maior a agregação plaquetaria, maior a transmissão da luz. O padrão agregométrico resultante permite identificar o defeito funcional: défice ou anomalia das glicoproteínas de membrana, defeitos do armazenamento ou secreção dos grânulos ou metabolitos.

- Citometria de fluxo: A citometria de fluxo permite a detecção de antígenos de superfície de forma sensível e específica simultaneamente. Deve ser aplicada nas plaquetas em estudo no estado não activo, para quantificação dos antígenos e no estado activado, para estudo qualitativo dos mesmos. Os antígenos mais importantes são: o receptor de ligação

ao FvW, complexo glicoprotéico Ib-IX-V (CD42a-d); o receptor de ligação ao colagénio GPIIb (CD36) e o receptor de agregação plaquetar glicoproteína IIb/IIIa (CD41/CD61). A presença dos antígenos pode ser quantificada nas plaquetas no estado não activo e a resposta das plaquetas aos diferentes agonistas de activação, pode ser estudada com anticorpos contra os marcadores de activação. A activação dos diversos receptores plaquetários irá, em última instância, levar à secreção de grânulos internos e reajustes do citoesqueleto, os quais participam nas vias de transdução de sinal responsáveis pela activação plaquetaria. Os marcadores mais importantes da activação plaquetária são: a P-selectina (CD62P), o complexo α IIb β 3 activado (PAC-1) e a proteína de membrana associada ao lisossoma (CD 63).

- Sequenciação de DNA, regiões ITGA2B E ITGB3, realizadas em laboratórios especializados. [13].

Diagnóstico Diferencial:

A tromboestenia de Glanzmann, patologia da hemostase primária, faz imediatamente diagnóstico diferencial clínico com as patologias da hemostase secundária, como a hemofilia ou a afibrinogenemia. As diferenças clínicas encontradas são:

Sinal/Sintoma	Patologia da hemostase primária	Patologia da hemostase secundária
Início do sangramento	Imediatamente após o trauma	Tardio após o trauma
Sangramento após pequenos traumas	Persistente e/ou em grandes quantidades	Mínimo
Equimoses superficiais	Característico, pequenas e numerosas	Raro
Petéquias	Comum	Raro
Hematomas superficiais	Raro	Comum
Hematomas profundos (musculares/ órgão interno)	Raro	Característico
Hemartrose	Raro	Característico
Sexo	Predomínio feminino	Predomínio masculino
Historia familiar	Rara (excepto na DvW)	Comum

Tabela 1: Diferenças clínicas entre patologia da hemostase primária e hemostase secundária. (George, By James N Caen, Jacques P Nurden, Alan T. Glanzmann's Thrombasthenia: The Spectrum of Clinical Disease. Blood. 1990. 75. 7).

A TG faz ainda diagnóstico diferencial com:

- Outras distúrbios plaquetarios hereditários: O síndrome de Bernard-Soulier, doença autossómica recessiva, caracterizado por um defeito no receptor

plaquetario GP Ib-IX-V com consequente défice de adesão plaquetaria, qual se diferencia de TG por este apresentar uma macrotrombocitopénia e ausência de resposta de agregação à ristocetina.

- Défices qualitativos de plaquetarios como o síndrome de Chediak-Higashi, o Síndrome Hemansky-Pudlak, o síndrome da plaqueta cinzenta, o Síndrome de Paris-Trousseau ou o Síndrome Quebec.

- Défices quantitativos, trombocitopénias, nomeadamente Trombocitopenia imune.

- Tromboestenias de Glanzmann adquirida, caracterizada pela presença de paraproteínas ou auto-anticorpos anti do complexo $\alpha\text{IIb}\beta_3$, associada ao uso de fármacos (como os bloqueadores do complexo $\alpha\text{IIb}\beta_3$), doenças linfoproliferativas (linfoma de Hodgkin), patologias auto-imunes e transplante de órgãos, excluídas mais facilmente se existir história de sintomas hemorrágicos familiares .

- Leucemia pró-mielocítica, pela sua associação à translocação 15-17.

- Défice 3 de adesão linfocitária, com défices imunológicos e infecções recorrentes.[2][5][10][14][15].

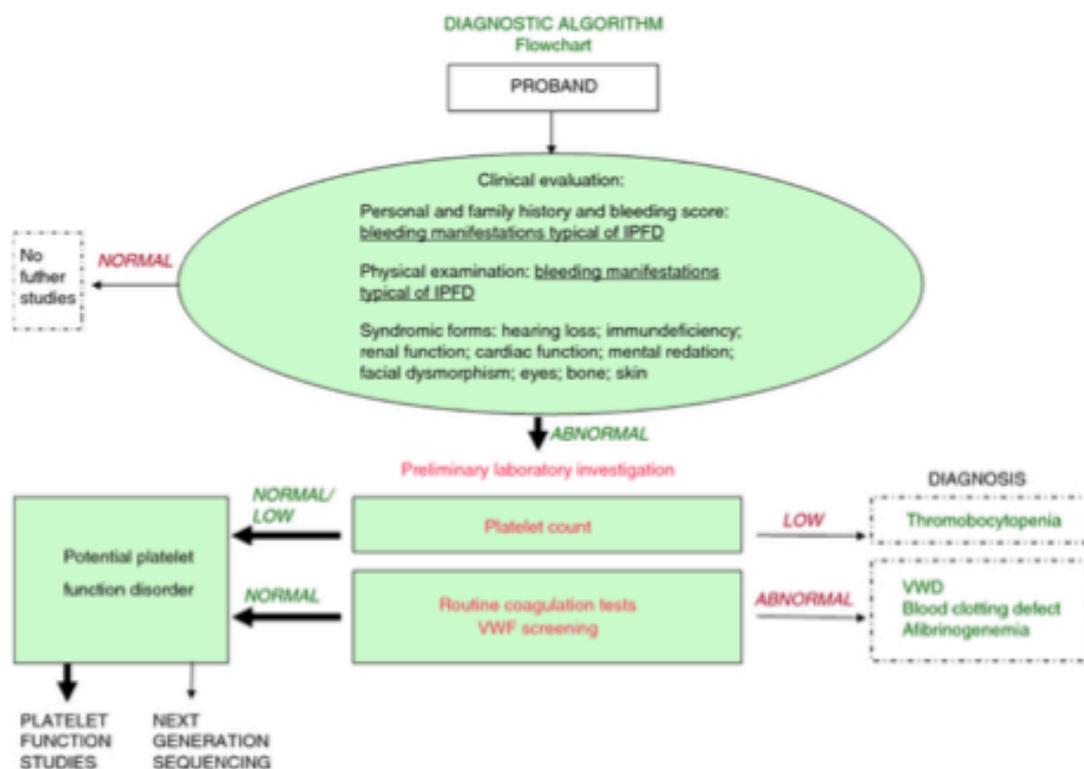


Diagrama 1: Algoritmo de diagnóstico de patologia plaquetária hereditária. (GresleP. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Jan 2015; 13, 314-322.)

Critérios de diagnóstico da tromboestenia de Glanzman:

- História de hemorragia mucocutânea, desde a infância;
- Análise quantitativa, tamanho e morfológica plaquetária com número e morfologia normal;
- Tempo de trombina normal, tempo de tromboplastina parcial activada normal, parâmetros de von Willebrand normais;
- PFA-100 > 300s, prologado;

- Agregação plaquetar em resposta a agonistas fisiológicos ausente com a excepção da ristocetina; expressão do complexo $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ por citometria de fluxo (CD 41/CD61) ausente, diminuído (não inclui variante);
- Análise genética com alterações no cromossoma 17q21.31. [3]

Tratamento

Não existe cura para esta patologia plaquetária hereditária, sendo o tratamento, até agora, o de suporte. Os objectivos do tratamento de suporte são: a criação de um sistema hemostático eficaz capaz de terminar com os episódios hemorrágicos, e o da prevenção de hemorragias, em caso de necessidade de

.intervenção invasiva, como uma cirurgia.
[1] [3]

Em hemorragias minor ou moderadas, como as gengivorragias, epistaxis, pequenas traumatismos, estão recomendadas medidas locais. A compressão com esponja gelatinosa/gaze concomitante ao uso de antifibrinolíticos, como o ácido aminocapróico ou o ácido tranexâmico e/ou aplicação de trombina tópica. Em casos de epistaxis recorrente são recomendadas medidas de prevenção como uma atmosfera húmida, uso de *sprays* nasais salinos e aplicação de vaselina na mucosa nasal. [1] [16].

Em relação às menorragias, que podem ser graves, sobretudo nos primeiros ciclos menstruais, está indicada a hormonoterapia com contraceção oral combinada, por vezes em doses mais elevadas que o normal. Em caso de menometrorragias graves e estado refractário plaquetar, poderá estar indicada a terapêutica cirúrgica com histerectomia por via vaginal [17]. No período de gestação é necessária a serotipagem de anticorpos antiplaquetários maternos, para que seja diminuído o risco de hemorragia fetal intrauterina e/ou trombocitopenia neonatal. No caso de aloimunização, que ocorre em 75% das gravidezes, é recomendada a determinação dos títulos

de anticorpos, e no caso desse ser elevado aconselha-se o uso de plasmaférese. No parto, é mandatório o uso profilático de transfusão de concentrado plaquetario, bem como na primeira semana do puerpério.[1] [18]

O tratamento da hemorragia grave e a profilaxia hemorrágica em caso de cirurgia ou procedimento invasivo (extracção dentária por exemplo) consiste na transfusão de concentrado plaquetario. No entanto também está indicado pela European Medicines Agency desde 2004, o uso de factor VIIa, em caso de doentes refractários ao concentrado plaquetario ou com aloimunidade plaquetaria. As doses recomendadas são 80 a 85 µg/Kg em bólus intravenoso, de duas em duas horas, sendo necessárias 3 ou mais doses (Fig.4). Todos os pacientes com sinais de hemorragia grave devem ser admitidos numa unidade de cuidados intensivos. [1] [19]

O transplante de células hematopoiéticas estaminais está indicado em casos muito selectivos: fenotipos graves, com episódios hemorrágicos graves recorrentes ou hemorragias com ameaça à vida e resistentes ao tratamento com concentrado plaquetario. [3][20].

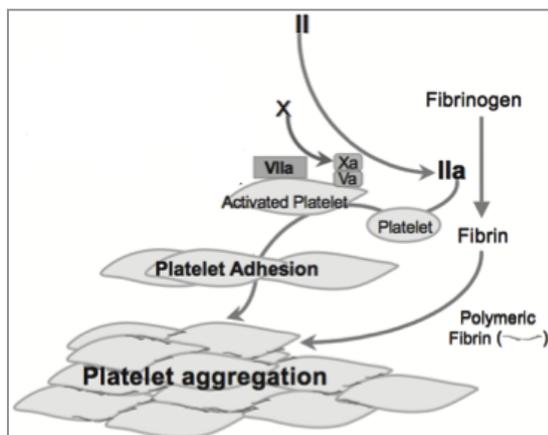


Figura 4: O FVIIa em concentrações elevadas (como na terapia com rFVIIa) pode ativar directamente o FX em FXa, e desta forma gerar grandes concentrações de trombina. O aumento da trombina resulta no aumento do número de plaquetas activas, numa maior superfície procuagulante e num aumento de conversão de fibrinogénio em fibrina. A fibrina para além de estabilizar o coagulo, pode ligar-se às plaquetas tromboesténicas a um receptor ainda não identificado e estimular a adesão plaquetaria. (Poon, Man-Chiu Clinical use of recombinant human activated factor VII (rFVIIa) in the prevention and treatment of bleeding episodes in patients with Glanzmann's thrombasthenia. *Vascular health and risk management* 2007. 3. 658).

A terapia genética será uma opção terapêutica alternativa numa perspectiva futura, que está no presente a ser investigadas e testada. Sabe-se que a síntese da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ocorre especifica e precocemente na megakarocitopoese, como consequência da presença no gene ITGA2B de elementos reguladores do promotor da subunidade αIIb . A utilização e integração da sequencia desse promotor num vector viral derivado do “*Murine Leukemia Virus (MuLV)*” e posterior transferência genética em células hematopoeticas CD34+ colhidas de dois pacientes com trombostenia de Glanzmann, foi testado “*in vitro*”. O

resultado foi a tradução e expressão subóptima de complexo $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. [3] [21]

A todos os pacientes com TG devem ser feitas recomendações preventivas gerais: anulação de comportamentos de risco com alta probabilidade traumática e uso de protecções, como o capacete, para actividades físicas lúdicas; a evicção administração de fármacos que interfiram com a hemostase, particularmente com a função plaquetaria (como a ácido acetilsalicílico e AINES); cuidados higiénicos orais regulares com frequentes limpezas profunda dos dentes realizada por médico dentistas; as unhas sempre cortadas para evitar traumatismos minor; vacinação extra-programa anti-hepatite A (pelo risco de transmissão sanguínea por transfusão) e um seguimento médico regular, para que possam ser compreendidos a frequência dos sintomas e risco de hemorragia grave, bem como a realização de hemogramas periódicos para monitorização da concentração de hemoglobina e necessidade de terapia com ferro oral e cuidados higiénicos orais regulares com frequentes limpezas profunda dos dentes realizada por médico dentistas. [1] [3] [10] [12] [16]

Um diagnóstico correcto do tipo de tromboestenia e da sua correspondente alteração molecular é importante, pois permite um melhor manuseamento

terapêutico. Um exemplo, é o risco associado a transfusões plaquetárias provocar aloimunidade contra o antígeno leucocitário humano (HLA) ou contra o complexo $\alpha\text{IIb}\beta_3$, e que ocorre mais frequentemente no tipo 1. A aloimunidade pode bloquear a agregação e aumentar a destruição plaquetar por mecanismos imunes, aumentando o risco de hemorragia grave tornando o paciente refractário à terapêutica. Por esta mesma razão e porque o tratamento de primeira linha nestes pacientes em caso de hemorragia grave ou profilaxia pré-cirúrgica é a transfusão plaquetária, a todos os pacientes é recomendada a genotipagem plaquetária precoce. [22]

É ainda recomendado o aconselhamento genético por especialista, *screening* mutacional do paciente e familiares. [2]

Caso clínico

Apresenta-se o caso de uma criança de 15 meses de idade, do sexo feminino, que aos 9 meses foi referenciada à Unidade de Hematologia pediátrica do hospital Santa Maria para investigação de “hemorragia cutânea frequente com traumatismos *minor* desde os 3 meses, manifestada por equimoses em locais pouco habituais”.

Filha única de pais não consanguíneos. Mãe de 34 anos, saudável, refere

equimoses fáceis desde a sua infância. Pai de 37 anos, saudável, sem história de discrasia hemorrágica. São negadas patologia de carácter hereditário.

Gravidez vigiada desde as 6 semanas, sem intercorrências. Serologias, análises e ecografias trimestrais sem alterações. Parto realizado por cesariana, por má progressão do trabalho de parto, às 40 semanas e 5 dias. Índice de apgar 10/10, peso ao nascer de 3425gr, comprimento de 49 cm, perímetro cefálico de 34,7 cm, parâmetros somatométricos adequados à idade gestacional. Teve alta da maternidade às 72 horas de vida. Período neonatal sem intercorrências. Aleitamento materno exclusivo até aos 4 meses, diversificação alimentar sem intolerâncias alimentares. Foi acompanhada por pediatra, apresentado um desenvolvimento estatura-ponderal adequado, com peso de P75; comprimento P75 e perímetro cefálico de P90. Desenvolvimento psicomotor aparente adequado. Programa nacional de vacinação actualizado com vacinas extra plano anti-pneumocócica e anti-rotavírus. Nega doenças anteriores relevantes, cirurgias, internamentos. Nega toma de qualquer medicação.

Historia da doença actual:

Em aparente estado de saúde até aos 3 meses de idade, período no qual os pais notaram o desenvolvimento de equimoses fáceis logo após a traumatismos *minor* (como pressão digital cutânea), com distribuição generalizada. Referem pequena hemorragia gengival ocasional no contexto de erupção dentária, com hemoestase espontânea. Negam outras perdas hemáticas. Negam hemorragias articulares e musculares. Negam outros sinais ou sintomas.

Ao exame físico, apresentava bom estado geral, pele e mucosas coradas e hidratadas. Apirética, anictérica e eupneica e com um boa perfusão periférica. À inspecção cutânea, apresentava múltiplas equimoses em diferentes fases de resolução, na área do tronco e nos quatro membros e petéquias dispersas pelo corpo. Sem alteração das mucosas. Fontanela anterior, normotensa. Pupilas isocóricas isoreactivas. Auscultação cardiopulmonar normal. Abdómen depressível e sem dor. Sem esplenomegália nem hepatomegália. Não se palpa adenomegalias

Nas consultas subsequentes, refere novos episódios de discrasia hemorrágica, com características semelhantes às anteriores e

ao exame objectivo hematomas com distribuição generalizada.



Figura 5: Discrasia mucocutânea manifestada por equimoses em diferentes estádios de desenvolvimento nos membros da criança apresentada.

Resultado de Meios complementares de diagnóstico

	11/07/13	15/12/14
Hemoglobina g/dL	10,3	11.4
VGM fL	67,3	75.4
HGM pg	20,7	35.2
Leucócitos uL	12110	14100
Plaquetas uL	613.000	346.000
Ferritina ng/ml	21,8	59.4

Data	11/07/13
T.P seg	11,1/11,6
aPTT seg	25/29
INR	0,96
Fibrionogénio mg/dL	299
FvWco	80%
FvW func	95%
Ag FvW	124%
FXI	110%
FVII	90%
FVIII	184%
FIX	103%
Ag FXIII	72%

Tabela 2: Resultado de exames complementares- volume globular médio (VGM); hemoglobina globular média (HGM); tempo de protrombina (TP); tempo de tromboplastina parcialmente activada (aPTT); índice internacional normalizado (INR); actividade do cofactor ristocetina (FvWco); factor de von Willebrand funcional (FvW func); antígeno de factor von Willebrand (Ag FvW); factor onze (FXI); factor sete (FVII); factor oito (FXIII); factor nove (FIX); antígeno do factor treze (Ag FXIII).

Esfregaço de sangue Periférico:

“Muito raras plaquetas gigantes. Ligeiro *rouleux*. Anisopoiquilocitose. Alguns neutrófilos hiposegmentados e monocitos vacuolados”.

Electroforese hemoglobina: “Normal”.

Platelet function analyser – 100:

PFA, teste com COL/ADP > 213 seg

PFA, teste com COL/EPI> 197 seg

Agregação plaquetar com Agonistas:

ADP: 18% e Colagénio:73%

Dada a anemia microcítica hipocromica, iniciou terapêutica com ferro oral 5 mg/Kg/dia.

Tendo em conta o quadro de discrasia hemorrágica e uma alteração na agregação plaquetária foi referenciada ao laboratório de coagulopatias do centro hospitalar e universitária de Coimbra, no qual realizou exames complementares de diagnostico específicos para disfunção plaquetar:

Platelet function analyser – 100:

PFA, teste com COL/ADP > 259 seg

PFA, teste com COL/EPI> 300 seg

Agregação plaquetar com Agonistas (ADP, colagénio, Ristocetina, Acido Araquidónico, Epinefrina, TRAP,DTT):

Normal com Ristocetina e DTT, muito diminuída com os restantes agonistas, incluído TRAP.

Estudos de plaqueta por citometria de fluxo:

- Quantificação de Glicoproteínas de membrana:

Normal

- Alteração conformacional GPIIb/IIIa PAC-1:

Diminuição da ligação ao PAC-1 após estímulo com TRAP 6 e ADP. O estudo de ligação ao fibrinogénio após activação com TRAP6 e ADP revelou diminuição de ligação do fibrinogénio, exceptuando com DTT.

- Activação plaquetar (CD62p, CD63):

CD62p diminuído após ADP e CD63 diminuído após TRAP.

- Sequenciação molecular:

Em curso

Realiza genotipagem HPA, para o caso de necessidade de ser transfundida com plaquetas:

HPA 1 a/b, 2 a/a, 3 a/a, 4 a/a, 5 a/b, 15 a/b.

Terapêutica

Está prescrita a utilização de antifibrinolíticos em caso de hemorragia ligeira ou cirurgia *minor*. Em caso de cirurgia major ou hemorragia incontrolável, transfusão com plaquetas, o mais compatível possível, ou tratamento com rFVIIa, de acordo com a avaliação clínica.

Evolução

Mantém-se com boa progressão estato-ponderal e psicomotora e com o mesmo padrão de discrasia hemorrágica.

Discussão

É apresentada a história de uma criança com discrasia mucocutânea de início precoce, manifestada por equimoses imediatamente após traumatismos minor (que se tornou mais evidente com a aquisição da autonomia motora) e hemorragia das gengivas com erupção dentária, sem outros sintomas/sinais ou outras manifestações de discrasia hemorrágica. As manifestações clínicas apresentadas obrigam à marcha diagnóstica entre patologias da hemoestase primária e secundária. A favor de patologia da hemoestase primária têm-se: o sexo feminino; ausência de história familiar conhecida; o surgimento de hemorragia directamente

relacionado com evento traumático *minor* e que ocorre prontamente após o mesmo; ausência de hemartroses espontâneas, hematomas intramusculares ou de órgão interno (típicos de patologia da hemoestase secundária). [23]

Esta distinção torna-se mais clara com o resultado dos exames complementares de diagnóstico: todos os parâmetros da coagulação dentro dos parâmetros normais. De seguida, foi excluída a hipótese da doença de *von Willbrand*, dada a sua elevada prevalência.

Em relação aos achados laboratoriais iniciais alterados - Hb 10,3g/dL, VGM 67,3 fL; HGM 20,7pg e ferritina 21,8ng/ml – diagnosticou-se uma anemia microcítica com ferritina no limite inferior do normal provavelmente secundário a perdas, justificada pela discrasia hemorrágica. A trombocitose (plaquetas 613.000 uL) é percebida como consequência da própria anemia (com desvio da linhagem celular no sentido das plaquetas da via hematopoética comum).

É então obrigatório considerar a hipótese eventual patologia plaquetária hereditária, nomeadamente de Tromboestenia de Glanzmann.

Os resultados dos estudos da função plaquetária, como o PFA-100 (que se apresentou aumentado) ou agregometria de transmissão óptica (com agregação diminuída com todos os agonistas da agregação à excepção da Ristocetina) revelam uma disfunção na função plaquetária com padrão típico da TG. Através da citometria de fluxo e imunofenotipagem foi possível quantificar as glicoproteínas plaquetárias, nomeadamente a GPIIb/IIIa, que se encontrava normal. Por tal, a hipótese de TG tipo IIB, forma variável, seria a mais adequada. A alteração conformacional GPIIb/IIIa PAC-1 e activação plaquetar diminuída observada pela mesma técnica apoiam a hipótese diagnóstica. Para que se preencham todos os critérios de diagnóstico é necessária a confirmação de alteração genética no cromossoma 17q21.31, dado que ainda não existe.

Pelo acima descrito, a hipótese diagnóstica mais provável até à data é a de Tromboestenia de Glanzmann tipo IIB.

No futuro...

Dada a natureza hereditária desta patologia o aconselhamento genético está indicado e é essencial.

Nesta, deve ser realizada o *screening* de todos os familiares de primeiro grau da criança. Neste poder-se-á detectar os portadores da mutação, e deste modo calcular o risco de transmissão para gerações vindouras, uma vez que o casal ainda se encontra em idade reprodutiva. A determinação da alteração genética ajuda inclusive a caracterizar melhor esta patologia e a sua prevalência, existindo uma base de dados mundial para as mutações descritas (<http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann/menu>). [24]

Diagnostico pré-natal.

É possível e necessário, quer para a possibilidade de novos filhos do casal quer para um futuro planeamento familiar da própria criança.

O diagnostico pré-natal tem sido realizado através dos marcadores polimorficos, BRCA1 e THRA1 do cromossoma 17 e através da quantificação da expressão do complexo α IIb β 3 das plaquetas do feto. A colheita de plaquetas fetais para a fenotipagem imunológica não deve ser realizada a partir de sangue do cordão umbilical, dado o risco de hemorragia intra-uterinas grave e aborto, caso o feto sofra da patologia. O DNA pode ser obtido a partir das vilosidades coriônicas. [1][25]

Agradecimentos

À Prof. Dra Maria João Parale, pelo seu apoio em todos as etapas da realização deste trabalho e à Dra. Teresa Sevivas, colaboradora do laboratório de coagulopatias do centro hospitalar e universitária de Coimbra pela disponibilidade e informação cedida.

Bibliografia

[1] Bellucci, S. Caen, J. Molecular basis of Glanzmann's Thrombasthenia and current strategies in treatment. Blood Reviews; 2002; 16; 193-202.

[2] Fiore, Mathieu Nurden, Alan T Nurden, Paquita Seligsohn, Uri; Clinical utility gene card for : Glanzmann thrombasthenia. 2012, 33.

[3] Wiegering, V. Sauer, K. Winkler, B. Eyrich, M. Schlegel, P. G.; Indication for allogeneic stem cell transplantation in glanzmann's thrombasthenia thrombasthenia; Hamostaseologie 2013; 33: 305-312.

[4]: Susan S. Plow, Edward F. Integrin α IIb β 3: From discovery to efficacious therapeutic target. Circulation Research. 2013. 112. 1189-1200.

[5]: Diz-Küçükkaya, Reyhan; Inherited platelet disorders including Glanzmann thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of

Hematology. Education Program;2013; 268-75.

[6] Nurden, a. T. Glanzmann thrombasthenia: The need for epidemiological studies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009. 7. 1875-1877.

[7] Kannan, Meganathan Yadav, Birendra Kumar Ahmad, Firdos Biswas, Arijit Saxena, Renu; Modulation of clinical phenotype of Glanzmann's thrombasthenia by thrombogenic mutations; *Clinica Chimica Acta*; 2009; 403, 156-158.

[8] Ragsdell B; Thachill J. Lessons from recurrent deep vein thrombosis in Glanzmann thrombasthenia. *Letters to Editors*. 2013. 391-393.

[9] Guiu I, Antón A, Padilla J, Velasco F, Lucia J, Lozano M, Rosa A, Sevivas T, Lopez.Fernandez M, Vicente V, Manchón C, Rivera J, Lozano M. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula : results from a collaborative study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014. 9:2013.

[10] Nurden A, pillois X; Wilcox D; Glanzmann Thrombasthenia: State of the Art and Future Directions; *Semin Thromb Hemost*. 2013. 39. 642-655.

[11] Kara, a Yarali, N Fisgin, T Duru, F; Spontaneous haemothorax: an uncommon presentation of Glanzmann thrombasthenia. *Acta paediatrica*. 2002. 91. 1139-1140.

[12] Borhany, M. Fatima, H. Naz, A. Patel, H. Shamsi, T.; Pattern of bleeding and response to therapy in Glanzmann thrombasthenia. *Haemophilia* ;2012. 18 399-425.

[13] Bolton-Maggs, Paula H B; Chalmers, Elizabeth a.; Collins, Peter W; Harrison, Paul; Kitchen, Stephen; Liesner, Ri J.; Minford, AdrianMumford, Andrew D.; Parapia, Liakat a.; Perry, David J.;Watson, Steve P.;Wilde, Jonathan T.;Williams, Michael D. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO; *British Journal of Haematology*; 2006; 135, 603-633

[14] Rosas, R. Raul Kurth, Margaret Heisel Sidman, James. Treatment and outcomes for epistaxis in children with Glanzmann's thrombasthenia. *Laryngoscope*. 2010. 120. 2374-2377

[15] Raman, Vinod Quillen, Karen Sloan, J. Mark. Acquired glanzmann thrombasthenia associated with hodgkin lymphoma: Rapid reversal of functional platelet defect with ABVD (Adriamycin/Bleomycin/Vinblastine/Dacarbazine) chemotherapy. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2014. 14 e51-e54. Franchini, Massimo Favaloro, Emmanuel J. Lippi, Giuseppe; Glanzmann thrombasthenia: An update, *Clinica Chimica Acta*; 2010. 411. 1-2.

- [16] Van Velzen, Jeroen F. Laros-Van Gorkom, Britta a P Pop, Gheorghe a M Van Heerde, Waander L. Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. *Thrombosis Research*. 2012. 130. 92-98.
- [17] George, By James N Caen, Jacques P Nurden, Alan T. Glanzmann's Thrombasthenia: The Spectrum of Clinical Disease. *Blood*. 1990. 75. 7.
- [18] Mairos, João S Bernardo, A N A C Neves, Anabela R Campos, A N A P Nunes, Filomena P João, S Trindade, Maria C Pereira, Alcides H Pereira, A N A Marques Falcão, Carlos B. TROMBASTENIA DE GLANZMANN Histerectomia vaginal de urgência tratada com factor VIIA recombinante. *Acta médica portuguesa*. 2004.17.180-182.
- [19] Murray, Nigel P Garcia, Claudio Ilabaca, Javier Lagos, Nestor; Case Report Management of Pregnancy in a Chilean Patient with Congenital Deficiency of Factor VII and Glanzmann ' s Thrombasthenia Variant, *HINDAWI*, 2014.
- [20] Rajpurkar, M Chitlur, M Recht, M DI, Cooper. Use of recombinant activated factor VII in patients with Glanzmann ' s thrombasthenia : a review of the literature, *Haemophilia*. 2014. 20. 464-471.
- [21] Franchini, Massimo Favaloro, Emmanuel J. Lippi, Giuseppe; Glanzmann thrombasthenia: An update, *Clinica Chimica Acta*; 2010. 411. 1-2.
- [22] Zonera, Author Ali, Ashraf Editor, Chief Besa, Emmanuel C; Glanzmann Thrombasthenia Mortality / Morbidity. 2014-1-4.
- [23] Nurden, Paquita; Congenital platelet disorders and understanding of platelet function; *British Journal of Haematology*; 2014. 165. 165-178.
- [24] Nurden A. GLANZMANN THROMBASTHENIA; 2005
- [25] Varkey, Indu Rai, Kavita Hegde, Amitha M Vijaya, Mangalpady Shenoy Oommen, Vinod Idicula. Clinical Management of Glanzmann ' s Thrombasthenia : A Case Report. 2014. 11. 242-247.