LEONARDO LORENZO DA SILVA

Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em relação a pacientes sob terapia antiplaquetária a base de ácido acetilsalicílico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Prof. Dr. Elbio Antonio D'Amico

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Leonardo Lorenzo da
Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em relação a pacientes sob terapia antiplaquetária a base de ácido acetilsalicílico / Leonardo Lorenzo da Silva. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Elbio Antonio D'Amico.

Descritores: 1.Plaqueta 2.Agregação plaquetária 3.Ácido acetilsalicilico 4.Turbidimetria 5.Impedância elétrica

USP/FM/DBD-279/10

ERRATA

Silva L.L. *Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em relação a pacientes sob terapia antiplaquetária a base de ácido acetilsalicílico* [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 51p

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
8	5ª	degranulação	desgranulação
18	12ª	tranformação	transformação
18	14ª	turibidimetria	turbidimetria
21	17ª	acetil-salicílico	acetilsalicílico
22	3ª	acetil-salicílico	acetilsalicílico
23	5ª	acetil-salicílico	acetilsalicílico

Este trabalho é dedicado especialmente

aos meus pais,

José Romeu da Silva

Terezinha Aparecida Lorenzo da Silva

Pelos incentivos para a concretização de mais essa etapa realizada em minha vida, resultado de toda uma vida de investimentos, dedicação, apostas e certezas depositados em seu filho

E a todos aqueles os quais nunca esquecerei . . .

o meu orientador,

Elbio Antonio D’Amico,

que me aceitou como estagiário e depois me conduziu durante esse tempo no mestrado com sua inesgotável paciência, competência e principalmente seu conhecimento

A Tânia Rubia Flores da Rocha, que, parcimoniosamente, me ensinou muitos dos mistérios do mundo da agregação plaquetária , e aos colegas do laboratório de coagulação da Fundação Pró-Sangue, Valéria, Cris, Regina, Diane e Luciana,

A minha irmã Gabriela, pelo forma única de apoio,

A minha avó Tereza, que sempre torce por mim,

Aos meus amigos Rodolfo, Andréa, Ana, Valdir, Mariana, Gilvete, Marcio e Fabrício, que de alguma forma me ajudaram nessa empreitada,

A Sheila, que foi a luz que me guiou em um dos momentos mais escuros da trajetória...ela sempre vai brilhar,

Aos meus avós maternos, Jorge e Maria, que onde quer que estejam sempre zelarão por mim,

Ao meu avô Romeu, que em toda a vida me incentivou a crescer com conhecimento, honestidade e honradez, e onde ele estiver estará orgulhoso e realizado

Muito obrigado!

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO 01
1.1 Plaquetas: Biologia e fisiologia 03
1.1.1 Adesão plaquetária 05
1.1.2 Ativação plaquetária 08
1.1.3 Mudança conformacional 13
1.2 Terapia a base de ácido acetilsalicílico 14
1.3 Agregação plaquetária 16
1.3.1 Agregação plaquetária por turbidimetria 16
1.3.2 Agregação plaquetária por impedância elétrica 19

2. OBJETIVO 22

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 23
3.1 Interpretação dos resultados obtidos 26
3.2 Análise estatística 27

4. RESULTADOS 28

5. DISCUSSÃO 35

6. CONCLUSÃO 40

7. ANEXOS 41

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

RESUMO

Silva L.L. *Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em relação a pacientes sob terapia antiplaquetária a base de ácido acetilsalicílico* [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 51p

A adesão de plaquetas nas paredes dos vasos sanguíneos e subsequente agregação são eventos cruciais tanto na hemorragia e quanto na trombose. A hiperagregação (agregação excessiva) das plaquetas pode causar a formação de um trombo e a posterior oclusão dos vasos sanguíneos levando a um processo isquêmico. A terapia antiplaquetária com ácido acetilsalicílico reduz em até 25% o risco de infartos do miocárdio não-fatais, acidentes vasculares cerebrais isquêmicos ou mortes de causa vascular em pacientes de alto risco, independentemente do sexo ou idade. Para avaliar laboratorialmente a eficácia dessa terapêutica, o método mais utilizado é o teste de agregação plaquetária, que pode ser feito em duas metodologias, a turbidimétrica e a por impedância elétrica. Com esse cenário, o objetivo do estudo é comparar essas duas metodologias para a monitorização do tratamento. Para isso foram utilizadas amostras de sangue de 30 pacientes adultos (média de 42 anos) de ambos os sexos que fazem uso regular do fármaco e analisadas através das duas metodologias, tendo seus resultados analisados e comparados. Os resultados do estudo mostraram pouca diferença estatística significante ($p<0,05$) entre os dois métodos nos principais agentes estimulantes, indicando que o método de impedância elétrica pode ser utilizado em rotina laboratorial

em substituição, ou em complementação, com a metodologia turbidimétrica para monitorar a terapia antiplaquetária a base de ácido acetilsalicílico.

SUMMARY

SILVA, L.L. *Comparative study between platelet aggregation by turbidimetric and impedance methods in patients under Acetylsalicilic Acyd antiplatelet therapy.* São Paulo, 2010. 51p. *Dissertation.* Medical School, University of São Paulo.

The adhesion of platelets in the blood vessel wall and subsequent aggregation are crucial events in both bleeding and thrombosis. The hyperaggregation (excessive aggregation) of platelets can cause the formation of a thrombus and subsequent occlusion of blood vessels leading to an ischemic process. Antiplatelet therapy with acetylsalicylic acyd reduces by 25% the risk of myocardial infarctions, non-fatal strokes or deaths from vascular causes in patients at high risk, regardless of sex or age. To laboratory evaluation of the effectiveness of this therapy, the method most used is the platelet aggregation test, which can be done in two methods, the turbidimetric and electrical impedance. With this scenario, the objective of the study is to compare these two methodologies for monitoring the treatment. For such purpose, blood samples from 30 adult patients (mean 42 years) of both sexes who make regular use of the drug was analyzed using the two methodologies, and their results was analyzed and compared. The study's results showed little difference statistically significant ($p < 0.05$) between the two methods with the main stimulant agents, indicating that the method of electrical impedance can be

used in routine laboratory instead or complementing the methodology of turbidimetric for monitor antiplatelet therapy by acetylsalicylic acyd.

1. INTRODUÇÃO

A adesão de plaquetas nas paredes dos vasos sanguíneos e subsequente agregação são eventos cruciais tanto na hemorragia e quanto na trombose. A hiperagregação (agregação excessiva) das plaquetas pode causar a formação de um trombo e a posterior oclusão dos vasos sanguíneos levando à isquemia, um evento que classicamente ocorre em território arterial, mas que também é descrito em território venoso.

A oclusão arterial por trombos plaquetários frequentemente é independente de hiperagregação plaquetária, já que existe uma lesão de parede vascular, sobre a qual ocorrem adesão e agregação plaquetárias, que são funções normais das plaquetas. Portanto, nessas situações, a atividade normal das plaquetas é que será inibida, uma vez que a ulceração da lesão vascular não pode ser prevenida.

Somando a isso, as plaquetas liberam fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que agem nas células da musculatura lisa dos vasos induzindo hiperplasia da camada vascular íntima. Esse fenômeno é responsável por doenças isquêmicas cardiovasculares como *angina pectoris*, aterosclerose, acidente vascular cerebral isquêmico, entre outras formas de isquemia[1].

A terapia antiplaquetária com ácido acetilsalicílico (AAS) reduz em até 25% o risco de infartos do miocárdio não-fatais, acidentes vasculares cerebrais isquêmicos ou mortes de causa vascular em pacientes de alto risco, independentemente do sexo, idade ou a presença de hipertensão arterial ou diabetes mellitus[2].

Com a finalidade de monitorar o efeito da terapia com AAS, o método laboratorial comumente empregado é a agregação plaquetária por turbidimetria, onde se quantifica a função plaquetária através de variações ópticas do plasma rico em plaquetas mediante a estimulação por determinados agentes agonistas tais como ADP (difosfato de adenosina), adrenalina, colágeno e ácido araquidônico[3].

Um método alternativo para se estudar a função das plaquetas é a agregação plaquetária por impedância elétrica ou em sangue total, onde um eletrodo é inserido em uma amostra de sangue total citratado, quantificando a variação na resistência elétrica à medida que as plaquetas nele se aderem e agregam por ação dos agentes estimulantes[4].

Vários autores divergem quanto ao uso dessas duas técnicas para medir o efeito da terapia a base do ácido acetilsalicílico e ainda qual o melhor agente agregante para uma monitorização mais fidedigna desse tratamento. O ácido araquidônico tem sido empregado para definir o monitoramento por promover alguma agregação de plaquetas, *in vitro,* mesmo quando o AAS é administrado em baixas doses aos pacientes, porém ainda não está claro se é o melhor agente agregante para tal finalidade, ou se a agregação por impedância supera

o método tradicional e largamente utilizado em todos os laboratórios por turbidimetria[1,5,6,7].

1.1 PLAQUETAS: BIOLOGIA E FISIOLOGIA

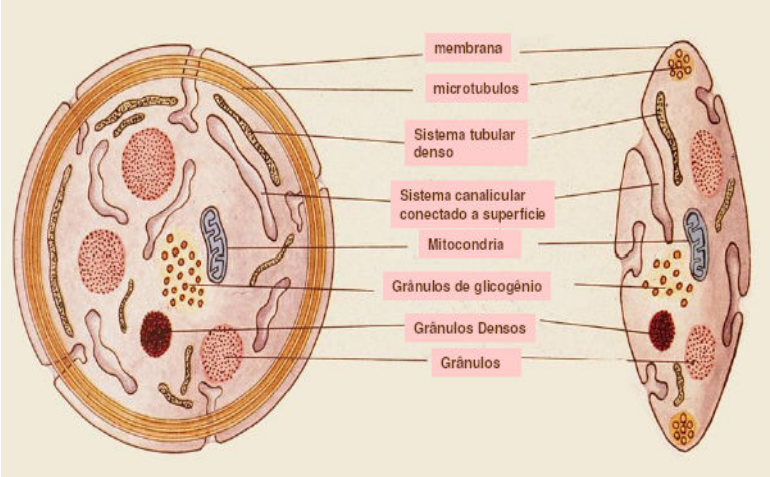
As plaquetas são fragmentos celulares anucleados, medindo 1,5 a 3,5 µm, derivados do seu precursor medular, o megacariócito. Como todas as membranas celulares, a membrana plaquetária é uma estrutura bilipídica, que tem logo abaixo dela uma rede de microtúbulos, que funciona como um citoesqueleto, mantendo a forma da plaqueta, quando em repouso, e sendo responsável pela alteração da sua conformação, quando ocorre a ativação (figura1)[8].

No citoplasma plaquetário são observados três tipos de grânulos, sendo que dois deles são fundamentais para as funções plaquetárias, os grânulos alfa e os grânulos densos (vide tabela 1). Finalmente, o citoplasma possui o sistema tubular denso e o sistema canalicular de membrana, que servem para as comunicações com o meio extracelular. Essa disposição de componentes faz com que as plaquetas sejam adaptadas para aderir aos vasos sanguíneos lesados, agregar com outras plaquetas e facilitar a geração local de trombina. Essas ações contribuem para a hemostasia com a formação do agregado plaquetário e sua estabilização pela ação local da trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina[8,9].

Tabela 1 – Grânulos plaquetários e seus constituintes principais [8,9]

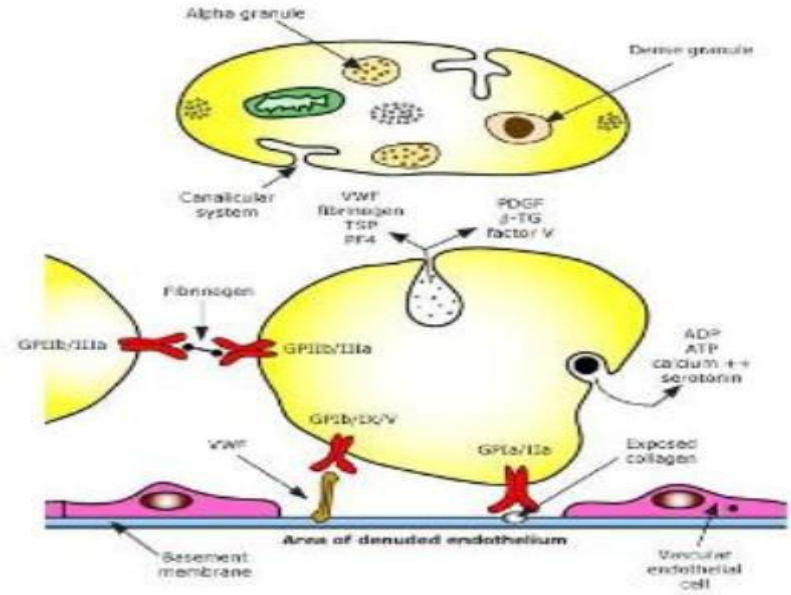
Grânulos α	Grânulos densos
Fator Plaquetário 4	ATP
Fibrinogênio	ADP
Fator V	Cálcio
Fibronectina	Serotonina
Fator de von Willebrand	P-selectina
Trombospondina	Catecolaminas
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	

Figura 1 - Morfologia plaquetária e suas organelas



Além das estruturas descritas, as plaquetas possuem vários receptores de superfície (figura 2), onde se incluem o complexo glicoprotéico (GP) Ib/IX/V, que promove a adesão das plaquetas ao se ligar ao fator de von Willebrand (FVW), a GPIIb/IIIa, que faz a mediação da agregação de plaquetas através da ligação com o fibrinogênio e / ou FVW, além de outros receptores, como GPIa/IIa para o colágeno, GPIc*/IIa para fibronectina e GPIc/IIa para laminina, que contribuem para a adesão e agregação plaquetárias[8].

Figura 2 - Receptores plaquetários e suas interações



1.1.1 Adesão plaquetária

A principal função das plaquetas é obstruir as aberturas que podem ocorrer nos vasos sanguíneos. Para isso é necessário que exista um evento que desencadeie a deposição e ativação das plaquetas e isto é representado pela exposição de porções internas da parede vascular. Este evento ou sinal inicial é dependente de algumas variáveis:

— Profundidade da injúria tecidual: tanto maior a profundidade da lesão, maior a exposição de materiais reativos e de fator tissular, que se encontra presente principalmente na camada adventícia dos vasos;

— Local da lesão: locais diferentes expõem fatores diversos;

— Idade do indivíduo: a composição da árvore vascular varia com a idade;

— Hematócrito: um número aumentado de hemácias favorece maior interação entre as plaquetas, assim como as forçam a circular mais próximo à periferia da parede vascular e, portanto, à curta distância de uma eventual lesão;

— Velocidade do fluxo sanguíneo e o tamanho dos vasos sanguíneos: irão determinar o número de plaquetas que passam e interagem pela área afetada em um dado intervalo de tempo, a concentração local dos agentes agregantes plaquetários, e a força que tende a empurrar as plaquetas contra as paredes vasculares e entre elas próprias (força de cisalhamento – *shear rate*)[8].

A força de cisalhamento afeta de maneira diferente a adesão e a agregação das plaquetas. A adesão dependente de FVW é mais importante em presença de altas forças de cisalhamento, provavelmente porque causa mudanças conformacionais no próprio FVW ou na GPIb[2]. Altas forças de cisalhamento podem levar a plaqueta a agregar por um mecanismo que envolve a ligação do FVW à GP Ib/IX/V, seguida da ativação da GP IIb/IIIa[3]. As plaquetas contribuem mais em trombos arteriais do que em trombos venosos, provavelmente devido as maiores forças de cisalhamento nos territórios arteriais[10].

A GPIb/IX/V é um receptor complexo, particularmente importante por mediar a adesão plaquetária ao FVW presente no subendotélio, sendo que esse receptor parece dominar a adesão em condições de altas forças de cisalhamento[10]. Três fontes diferentes contribuiriam para o FVW subendotelial:

- Síntese pelas células endoteliais;

- Deposição de FVW do plasma circulante, e
- Liberação dos grânulos α das plaquetas[8].

A adesão de plaquetas em estruturas subendoteliais pode por si própria causar ativação das plaquetas, de maneira a resultar na geração de tromboxano A_2 (TXA_2), secreção de ADP, serotonina e demais componentes dos conteúdos granulares, além da ativação do receptor GPIIb/IIIa para seu estado de alta afinidade de ligação. De acordo com a natureza da superfície que as plaquetas aderem, elas sofrem reações de alongamento e ficam ancoradas por um processo que envolve ligação do receptor GPIa/IIa com o colágeno, exposto na matriz subendotelial, e a ativação do receptor GPIIb/IIIa[8].

Os receptores GPIIb/IIIa ativados podem, então, se ligar ao FVW e/ou fibrinogênio, fazendo ligações com outras plaquetas que foram ativadas, como resultado da exposição do ADP e TXA_2 secretados. Esse processo de interligação das plaquetas é repetido várias vezes, resultando na formação de várias camadas plaquetárias e, por fim, no tampão plaquetário[8].

As plaquetas agregadas facilitam a geração de trombina por diferentes mecanismos, incluindo formação de microvesículas, exposição de fator Va, exposição de fosfolípides de carga elétrica negativa na superfície plaquetária. A trombina gerada promove uma maior ativação das plaquetas causando extensa degranulação e ativação dos mecanismos de coagulação, culminando com intensa deposição de fibrina, que reforçará o tampão plaquetário e promoverá sua retração. Além disso, a trombina tem importante ação sobre as plaquetas,

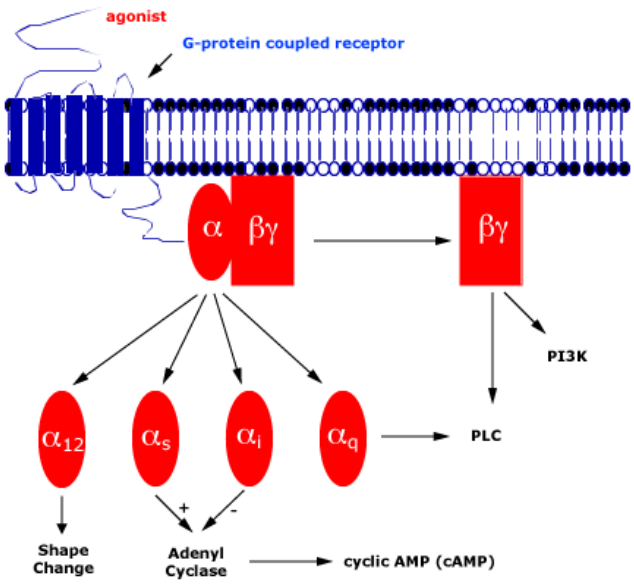
já que inativa a GPIb/IX/V e ativa ainda mais a GPIIb/IIIa, provavelmente facilitando a transição da adesão para a agregação plaquetária[8].

Muitos fatores inibem a ativação plaquetária e previnem sua deposição excessiva. Os efeitos dilucionais do sangue circulante são provavelmente os mais importantes. As células epiteliais sintetizam dois potentes inibidores da ativação plaquetária, a prostaciclina e o óxido nítrico. Em adição, as plaquetas ativadas liberam microvesículas que transferem ácido araquidônico para as células endoteliais, o que aumenta a produção de prostaciclina, contribuindo significantemente para a inibição da agregação plaquetária nos locais afetados[8].

1.1.2 Ativação plaquetária

Muitos agonistas plaquetários, incluindo trombina, ADP, adrenalina e tromboxano A_2 ligam-se a receptores específicos de superfície, causando a ativação das plaquetas, com expansão da sua membrana. A porção citoplasmática desses receptores interage com as proteínas-G (figura 3), que são constituídas de uma subunidade α e uma βγ ligantes de GTP (guanosina 5'-trifosfato). Quando o GDP (guanosina 5'-difosfato) está ligado na subunidade α, a proteína-G encontra-se inativa. Quando estimulados por agonistas, os receptores promovem a troca do GDP por GTP, mudando a proteína G. As proteínas G têm uma duração limitada de atividade, depois do qual são desativadas por fosforilação e, em alguns casos, depuradas da superfície por mecanismo de endocitose[11].

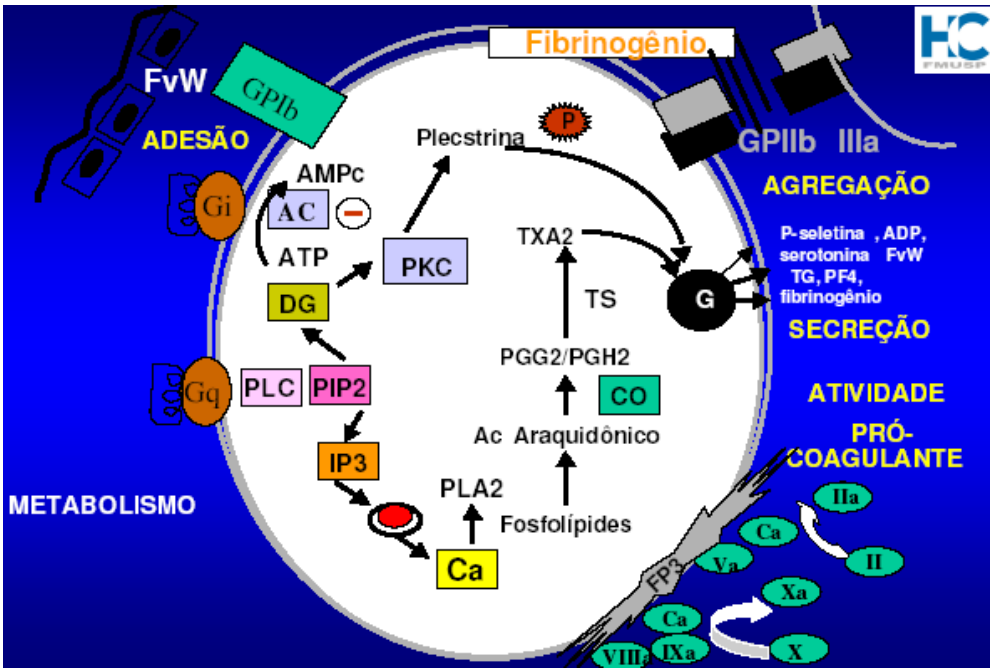
Figura 3 - Proteína G e suas subclasses



As subclasses das subunidades α caracterizam a função de diferentes proteínas G, e, consequentemente, o papel dos receptores que estão associados a elas. Receptores que se associam com proteínas G contendo uma G α-q subunidade estimulam a hidrólise do fosfoinositídeo pela fosfolipase C.

Receptores acoplados com a proteína G α subclasse *s* estimulam a formação de AMP cíclico (cAMP). Proteína G α subclasse *i* estimulam a fosfatidilinositol 3-quinase e a fosfolipase C. Finalmente, as subclasses 12/13 estimulam vias que promovem mudanças conformacionais através de hidrólise do fosfoinositideo (figura 4)[11].

Figura 4 - Cascata de segundos-mensageiros bioquímicos plaquetários após ativação



A ativação de alguns de receptores também leva à ativação da fosfolipase A_2, que libera ácido araquidônico das reservas lipídicas da membrana celular. O ácido araquidônico é rapidamente convertido no sistema tubular denso em produtos de prostaglandinas, PGH_2 e TXA_2, que são potentes ativadores plaquetários[8].

Os agonistas plaquetários são classificados como fracos e fortes, provavelmente refletindo diferenças nos sinais intracelulares causados por eles. Agonistas fortes (como trombina e TXA_2) estimulam a hidrólise do fosfoinositídeo e são relativamente pouco afetados por inibidores da cicloxigenase. Os agonistas fracos (como ADP e adrenalina) têm pouca ou nenhuma habilidade de causar a hidrólise do fosfoinositídeo e são mais dependentes da formação do TXA2 para promover seus efeitos[12].

Trombina

É o agonista plaquetário mais potente. *In vitro,* quando são adicionadas concentrações picomolares, causa hidrólise de fosfoinositídeo, formação de TXA_2, fosforilações de proteínas e aumento na concentração de cálcio intracelular. Essas vias promovem mudanças na forma e agregação das plaquetas, com secreção dos grânulos. Receptores de trombina são ativados por clivagem em sitio específico expondo terminais – N, que interagem com resíduos localizados na porção intracelular do receptor. Essa interação resulta na ativação da proteína G na superfície citoplasmática do receptor, e sinalizações adicionais[8,12].

ADP

A molécula do ADP é armazenada nos grânulos densos e liberada quando há ativação plaquetária. Outra fonte importante de ADP são os eritrócitos, sendo que há liberação de ADP eritrocitário quando as hemácias sofrem lesão em locais com força de cisalhamento elevada. O ADP interage com dois receptores purinérgicos (P_2Y_1 e P_2Y_{12}) ligados a proteínas G. Quando o ADP estimula o receptor P_2Y_1 através da proteína G subclasse q, ocorre hidrólise do fosfoinositídeo, seguido da formação de TXA_2, fosforilação protéica e aumento do cálcio intracelular. O ADP também estimula o receptor P_2Y_{12} através da proteína G subclasse α, inibindo a formação de cAMP. Toda essa sequência bioquímica leva à mudança conformacional da plaqueta, formação de TXA_2, secreção dos grânulos e ativação de GPIIb/IIIa, causando a agregação plaquetária[8,12].

Adrenalina

A resposta plaquetária por ação da adrenalina é mediada pela subclasse i das proteínas G, através de receptores adrenérgicos. A adrenalina inicia uma primeira fase de agregação sem induzir mudança conformacional. A adrenalina causa um aumento no cálcio intracelular e posterior liberação de TXA_2, aumentando a agregação plaquetária[8,12].

Tromboxano A_2

O metabolismo do ácido araquidônico em TXA_2 é um dos caminhos fundamentais para induzir ativação e agregação plaquetárias. O TXA_2 é um potente agonista que estimula todas as subclasses da proteína G. Muitos agonistas estimulam a liberação de ácido araquidônico da molécula de fosfatidilcolina na membrana plaquetária por ação da fosfolipase A_2. O ácido araquidônico é então metabolizado pela cicloxigenase-1 (COX-1) em prostaglandina 2 e depois em TXA_2 pela tromboxano sintase[8].

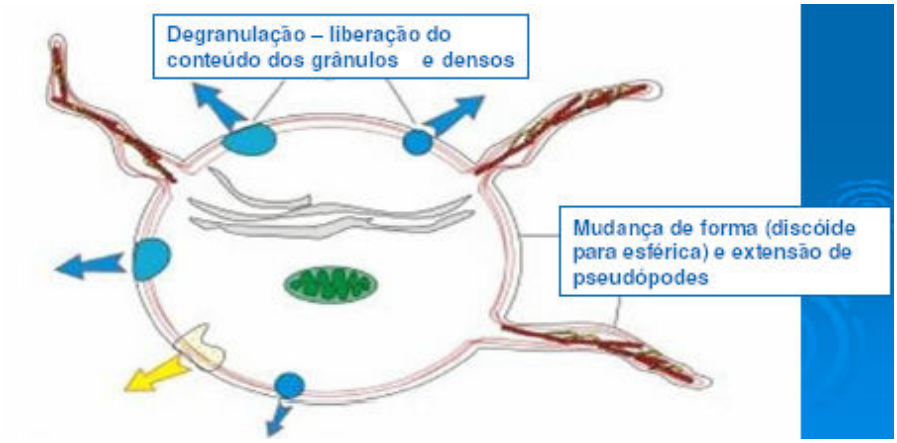
Colágeno

Após lesão vascular, o colágeno fica exposto no subendotélio e também ao fluxo sanguineo e promove adesão e ativação das plaquetas através dos receptores GPIa/IIa e GPVI e proteínas G. O colágeno é tido como umas das mais poderosas substâncias trombogênicas nas placas ateroscleróticas, e, assim, sua ruptura contribui enormemente para a formação de trombo e lesões isquêmicas[8].

1.1.3 Mudança conformacional

Um dos eventos mais críticos durante a ativação plaquetária é a metamorfose que ocorre quando as plaquetas aderem e se alongam sobre fibras de colágeno exposto, tornando-se ativas. As plaquetas perdem sua forma discóide e adquirem morfologia irregular com múltiplas projeções citoplasmáticas, sendo que esta transformação está associada com rearranjos no citoesqueleto plaquetário (figura 5).

Figura 5 – Mudança conformacional plaquetária e emissão de pseudopodes



O citoesqueleto plaquetário está organizado em três estruturas principais: Uma rede de actina citoplasmática, um citoesqueleto (composto de actina, filamina, vinculina, espectrina e glicoproteínas de membrana) associado à membrana celular, e uma espécie de “bastão” consistindo de microtúbulos. Juntos suportam a membrana plasmática da plaqueta, dando forma tanto as plaquetas ativadas e em estado de repouso[8].

O processo de mudança de conformação plaquetária, em geral, é regulado pelo aumento nos níveis intracelular de fosfatidilinositol, que acompanha a ativação das plaquetas. Ao mesmo tempo, filamentos de miosina são fosforilados e associados com filamentos de actina. Após isso são

formados filamentos que são ancorados na membrana plasmática plaquetária por contato no complexo GPIb/IX/V via proteína ligadora de actina (através de clivagem própria por aumento de cálcio intracelular).[8,12]

1.2 Terapia a base de ácido acetilsalicílico

Atualmente diversos fármacos de ação antiplaquetária estão disponíveis na prática clínica, com mecanismos de ação diferentes. Podendo atuar no processo de ativação, adesão, reações de liberação ou agregação plaquetária[13].

O fármaco mais prescrito atualmente para bloquear a atividade plaquetária é o ácido acetilsalicílico (AAS). O AAS inibe a ciclooxigenase-1 (COX-1), uma enzima constitutiva, por acetilar o resíduo de serina na posição 529, o que bloqueia irreversivelmente o acesso do ácido araquidônico ao sítio catalíco da enzima. Esse bloqueio, suprime a produção de TXA_2. O restabelecimento da função plaquetária somente ocorre quando as plaquetas inibidas forem destruídas fisiologicamente e novas passem a circular[5,14,15].

O AAS é rapidamente absorvido no estomago e intestino. O pico de concentração plasmática ocorre aproximadamente 30 – 40 minutos após a ingestão do fármaco, e a inibição da função plaquetária fica evidente após 1 hora. Algumas apresentações tamponadas e de revestimento entérico podem levar até 4 horas para atingir o pico de concentração plasmática, devido ao pH ideal para a absorção do AAS , que deve ser baixo[13].

O AAS possui uma meia vida plasmática de aproximadamente 20 minutos, porém apesar dessa depuração rápida da circulação, o efeito de uma dose única de AAS pode perdurar por até 10 dias, que é o tempo de sobrevida plaquetária. A atividade da COX-1 está presente em muitos tecidos, incluindo o endotélio. Contudo, como essas são células nucleadas elas possuem a capacidade de produção de novas moléculas de COX-1, recuperando a função normal dentro de poucas horas após a administração do AAS. Portanto o efeito de uma dose única de AAS produz efeito sistêmico apenas transiente, mas que é duradouro apenas nas plaquetas. O AAS também é capaz de inibir a enzima COX-2, que é produzida apenas em estados inflamatórios, porém as plaquetas não possuem essa enzima sob condições fisiológicas[5,13,15].

Diversos estudos mostram que o AAS é um efetivo agente antitrombótico quando utilizado regularmente em doses variando entre 50 e 100 mg por dia. Doses superiores (300 – 1200 mg por dia) não mostraram diferença na eficácia quando comparado a doses menores[13,16].

O uso de doses menores de AAS (50 – 100 mg/dia) é atualmente a estratégia mais apropriada para maximizar a eficiência do AAS e reduzir seus efeitos adversos.[(13)].

O AAS não causa sangramento generalizado, salvo se for administrado a pacientes com distúrbios de hemostasia. A toxicidade gastro-intestinal do fármaco é dose dependente, porém também observada em doses pequenas. Com esse quadro, faz-se mister o clínico ponderar entre os riscos e benefícios

do tratamento antes de começar. Logo, em indivíduos com baixo risco de oclusão vascular um benefício muito pequeno é obtido se comparado com os riscos de sangramento e toxicidade gastro-intestinal[13].

1.3 Agregação plaquetária

1.3.1 Agregação plaquetária por turbidimetria

O método clássico mais usado para se estudar a função plaquetária é medindo, por densidade óptica (turbidimetria), a agregação das plaquetas em plasma rico em plaquetas (PRP) mediante adição de agonistas de escolha, como ADP, colágeno, ácido araquidônico, adrenalina e ristocetina. O PRP é obtido por centrifugação do sangue anticoagulado por 10 minutos a 1000 rpm, deixando-se a contagem plaquetária desse plasma em aproximadamente 250.000 plaquetas/μL. A densidade óptica do PRP cai à medida que as plaquetas vão formando agregados.

A quantidade e a velocidade da diminuição da densidade óptica é altamente relacionada e dependente da reatividade das plaquetas quando variáveis como contagem de plaquetas, velocidade ou agitação de mistura e temperatura são controladas (velocidade de agitação de 1000 rpm e temperatura e 37ºC).

O efeito dos agentes estimulantes é observado monitorando-se as mudanças na densidade óptica do PRP. Essa densidade óptica é monitorada usando-se um agregômetro com um fotômetro na qual é conectado um

registrador para que os resultados sejam registrados em um gráfico (figura 6 e 7)[17].

ADP é um agonista fraco comparado com colágeno ou trombina, no PRP, baixas concentrações do agente forma apenas uma pequena onda transiente de agregação, mas a concentrações entre 1 a 3 μM, a agregação primária é irreversível e é seguida por uma também irreversível segunda onda, essa segunda onda é altamente dependente da formação de TXA_2. Fármacos como o AAS inibem a formação do TXA_2 prevenindo a formação da segunda onda induzida por ADP[17].

O agonista mais fraco, a epinefrina (empregado na concentração final de 5-10μM), agrega as plaquetas sem a mudança inicial na conformação das plaquetas, e devido a natureza fraca do agonista, a agregação fica extremamente comprometida com inibidores da formação de TXA_2.

O colágeno causa uma fase inerte característica antes que ocorra agregação, que necessita a formação e liberação de TXA_2, drogas que inibem essa condição bloqueiam a agregação em respostas a concentrações baixíssimas do agregante.

Como o ácido araquidônico é o passo inicial para a formação de TXA_2, drogas que inibam a COX-1 impedem a tranformação desse ácido em TXA_2 não ocorrendo então agregação plaquetária.[17,18]

Figura 6 – Agregação plaquetária por turibidimetria

PRP

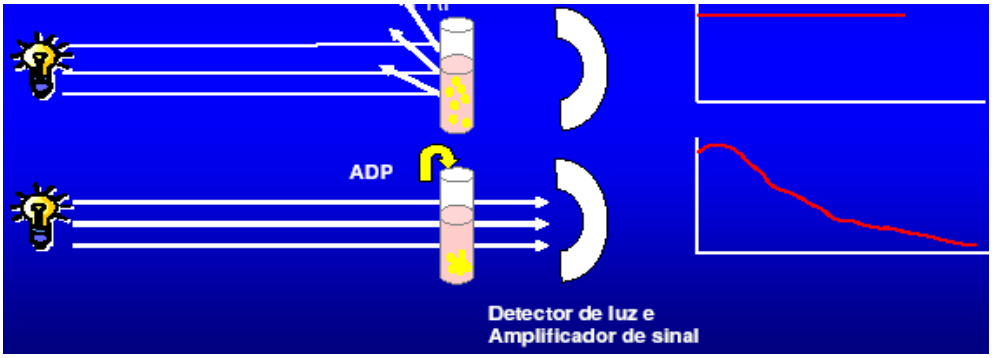
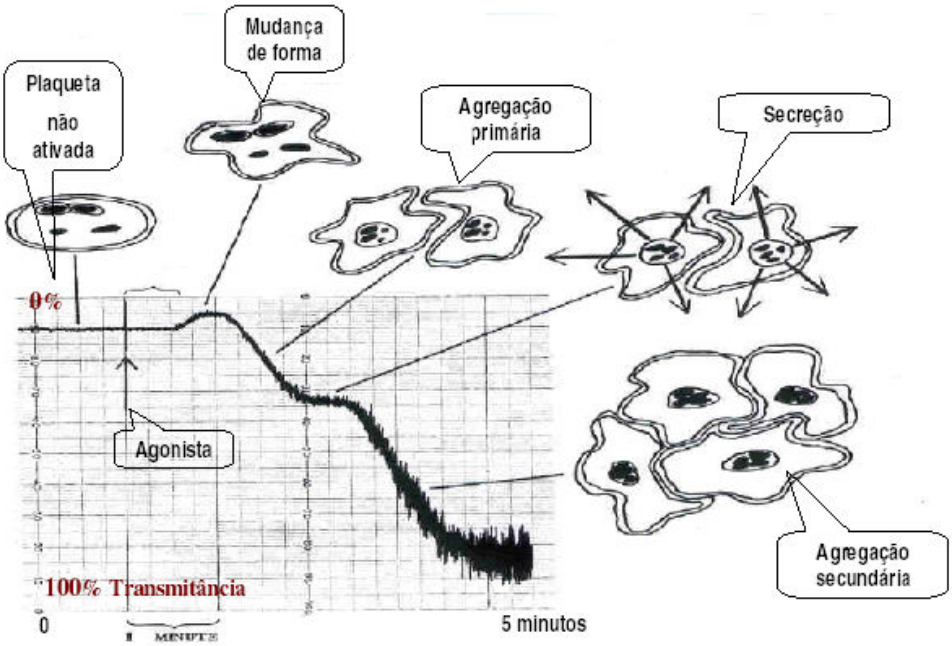


Figura 7 – Traçado de onda característico de uma agregação plaquetária por turbidimetria



1.3.2 Agregação plaquetária por impedância elétrica

Esse é um método alternativo para se pesquisar a função plaquetária, onde uma amostra de sangue total é diluída 1:1 com solução salina e colocada em uma cubeta onde é inserido um eletrodo constituído por dois finos fios de paládio (figura 8).

Figura 8 - Eletrodo

As plaquetas, devido à carga elétrica negativa de sua membrana, inicialmente aderem a esses fios, formando uma monocamada plaquetária.

Uma pequena diferença de voltagem é então aplicada nos dois fios e a impedância causada pela cobertura de plaquetas nos eletrodos é medida, deixando as interações entre os fios e as plaquetas estabilizarem até a impedância ficar constante, estabelecendo um basal (*baseline*).

Quando um agonista é adicionado as plaquetas são ativadas e começam a agregar e a cobertura de plaquetas sobre os fios se torna maior e mais rígida nos minutos seguintes aumentando a impedância entre os fios do eletrodo. Essa variação é diretamente proporcional com a extensão da agregação e é registrada e medida em ohms após 6-12 minutos[4].

A agregação por impedância elétrica permite a análise de amostras hemolisadas e lipêmicas (a técnica turbidimétrica não possibilita essas condições pois não há formação de um basal devido a alta turbidez da amostra) e plaquetopênicas superiores a 50000 plaquetas por milímetro cúbico, contra 90000 a 100000 da técnica turbidimétrica (a turbidez da amostra pode ser igual ou próxima do plasma pobre em plaquetas) [19].

Nos últimos 40 anos os efeitos inibitórios das drogas na agregação plaquetária foi extensivamente estudado utilizando métodos ópticos no PRP por turbidimetria, que apesar do provado valor de diagnóstico possui certas limitações. Por causa da necessidade de centrifugação, o PRP contém apenas plaquetas, sem eritrócitos e leucócitos, que afetam a agregação. As plaquetas também são heterogêneas no seu tamanho, densidade, atividades metabólicas e fisiológicas, e durante a centrifugação algumas dessas populações plaquetárias são perdidas, como as plaquetas gigantes e macroplaquetas. No preparo do PRP por centrifugação pode ocorrer ativação das plaquetas afetando a sensibilidade quanto ao estímulo agregante. Portanto, a estimação do efeito anti-agregante de fármacos por PRP e turbidimetria pode não traduzir o que realmente acontece *in vivo.* Por essas razões pode-se pensar em estimar a agregação plaquetária diretamente no sangue total, meio mais próximo ao que ocorre *in vivo*, devido à não necessidade de separação das plaquetas das outras células do sangue, o que torna a técnica mais rápida podendo reportar ao clínico os resultados da monitorização em tempos mais curtos[1,19,20].

Porém vários autores divergem quanto ao uso dessas duas técnicas para medir o efeito da terapia a base de AAS ou da sua resistência e ainda qual o melhor agente agregante para uma monitorização mais fidedigna do tratamento. O ácido araquidônico têm sido usado para definir monitorização por promover alguma agregação de plaquetas, *in vitro,* mesmo em baixas doses de ácido acetilsalicilico administradas aos pacientes, porém ainda não está claro se é o melhor agente agregante para tal finalidade u se a agregação por impedância supera o método tradicional por turbidimetria e largamente utilizado em todos os laboratórios[1,5,6,7].

2. OBJETIVO

Comparar o método de agregação plaquetária turbidimétrico com o método em sangue total (impedância) em pacientes sob tratamento regular com ácido acetil-salicílico.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Após consentimento informado e esclarecido, foram estudados 30 (trinta) pacientes de ambos os sexos[21,22] que obedeceram aos seguintes critérios de inclusão:

- idade igual ou superior a 18 anos (média de 42 anos ; s = 13 anos);
- uso regular de ácido acetil-salicílico, por tempo igual ou superior a 30 dias;
- ausência de uso de drogas anti-inflamatórias não hormonais por tempo igual ou superior a 48 horas, e
- intervalo de tempo entre o evento trombótico, que motivou o uso da aspirina, e a coleta das amostras para estudo da agregação plaquetária igual ou superior a 3 meses.
- Não ter história de anemia ou qualquer outra doença hematológica;
- Ter contagem de plaquetas normal.

O grupo controle foi formado por 30 doadores de sangue normais, aceitos para doação na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo e obedeceram os critérios da fundação para a doação, que incluem hematócrito normal e ausência de uso de AAS[23,24,25].

Através de punção atraumática, foram coletados 1 tubo Vacutainer® de 3,5mL contendo 3,2% de citrato de sódio (1:9 volume) para estudo da agregação plaquetária em impedância elétrica, e 2 tubos para avaliação da agregação plaquetária em PRP. Foi obedecida a técnica padrão, de modo que foram desprezados os primeiros 10 mL de sangue, visando a ausência de

fatores que possam interferir com a agregação plaquetária, decorrentes da punção venosa.

Os testes foram realizados obedecendo os seguintes critérios:

Agregação por turbidimetria ou em plasma rico em plaquetas (PRP):

O método é baseado em promover a agregação das plaquetas em plasma rico em plaquetas (PRP) mediante a ação de vários agonistas, ácido araquidônico, ADP e colágeno, e o resultado da agregação é medido em densidade ótica. A densidade óptica do PRP diminui à medida que as plaquetas vão formando agregados. A intensidade e a velocidade dessa diminuição é altamente relacionada e dependente da função das plaquetas. Essa densidade óptica será monitorada usando-se agregômetro Chronolog® modelo 540 com um fotômetro, conectado um registrador.

O PRP foi obtido após centrifugação da amostra de sangue coletado por 10 minutos a 1000 rpm, deixando-se a contagem plaquetária desse plasma em aproximadamente 250.000 plaquetas/mL, determinada através da contagem em câmara de Neubauer. A promoção da agregação nesse PRP se dará mediante a adição dos seguintes agentes agregantes em determinadas concentrações, tradicionais na literatura[17,19,20]:

Ácido araquidônico: 1mM;

Colágeno: 2μg/mL;

ADP: 0,75μM e 7,5μM.

Agregação por impedância ou sangue total:

Esse método se baseia na promoção da agregação das plaquetas em sangue total citratado, mediante da ação dos mesmos agentes agonistas acima descritos, porém em diferentes concentrações, de acordo com a literatura[17,19,20]:

Ácido araquidônico: 0,5μM;

Colágeno: 1,25μM;

ADP: 5μM e 10μM.

Em uma cubeta de reação, própria do aparelho, o sangue total é diluído 1:1 com solução salina, que vai também funcionar como uma adjuvante na passagem de corrente elétrica no sistema. Após a adição do eletrodo na cubeta espera-se a estabilização do sistema, seguindo da adição dos agentes agonistas acima. A agregação das plaquetas é medida por impedância (resistência elétrica), e à medida que as plaquetas se agregam, vai ocorrendo um aumento na resistência elétrica em um eletrodo de platina colocado em contato com o sangue total. Analogamente à turbidimetria, esse aumento é proporcional à função plaquetária e é registrado pelo software Aggrolink® do agregômetro Chronolog® modelo 540 em uma curva.

3.1 Interpretação dos resultados obtidos

Há uma divergência de opiniões quanto a interpretação dos resultados de uma agregação plaquetária turbidimétrica. Há serviços e autores que defendem a interpretação dos resultados baseados na amplitude final da curva de agregação, expressa em porcentagem de transmitância da luz, assim classificando a curva como hipoagregante, normoagregante ou hiperagregante em relação os valores normais estabelecidos. Outros serviços e autores preferem a interpretação baseada na estrutura ou morfologia da curva de agregação, tomando-se em consideração a formação de primeira e segunda ondas, presença ou ausência de desagregação plaquetária (diminuição na taxa de transmitância após a agregação inicial) levando em consideração as fases do processo funcional das plaquetas (ativação de receptores/liberação de grânulos), como descrito na figura 7. Assim, a curva será caracterizada como hipoagregante, hiperagregantes e normoagregante.

A agregação por impedância é caracterizada classicamente apenas pelo valor da amplitude máxima, pois a mesma não produz uma segunda onda de agregação, havendo apenas uma única onda.

Neste trabalho foram empregadas as duas formas de interpretação da agregação plaquetária turbidimétrica, tanto a numérica quanto a descritiva para nossa avaliação dos resultados[19].

3.2 Análise Estatística

Para a análise dos resultados da pesquisa utilizamos a ferramenta estatística da distribuição *t* de *student*[22] com intervalo de confiança de 95% ($\alpha<0,05$)[22].

4. RESULTADOS

Na tabela 2 (em anexo) estão relatados os resultados obtidos de amplitude máxima para a agregação plaquetária por impedância nos doadores normais.

Na tabela 3 estão descritos os resultados da agregação plaquetária pelo método de impedância na população controle normal, onde o limite inferior corresponde a MÉDIA – 2 desvios padrões (s) e o limite superior corresponde a MÉDIA + 2s[22,25].

Tabela 3 – Resultados obtidos com os resultados de amplitude máxima em impedância elétrica (expressa em ohms,Ω) no grupo controle (n=30)

	ADP 10	ADP 5	AA	COL
Média(Ω)	11,1	5,3	12,4	17,4
Desvio Padrão (s) (Ω)	3,0	3,2	3,0	2,0
2s (Ω)	5,9	6,3	6,0	4,1
Limite Inferior (Ω)	5,1	1	6,3	13,3
Limite Superior (Ω)	17,0	11,6	12,4	21,4

Na tabela 4 (em anexo) estão descritos os resultados para o valor e amplitude máxima de agregação pelo método de turbidimetria para o grupo controle. Para se considerar uma curva como normoagregante foi considerado o valor de amplitude máxima e um traçado semelhante ao padrão normal.

Na tabela 5 estão os resultados da agregação plaquetária pelo método turbidimétrico na população normal com os diferentes agentes agonistas empregados.

Tabela 5 – Resultados de agregação plaquetária em turbidimetria, no grupo controle (n=30)

	ADP 7,5uM (%)	ADP 0,75uM (%)	AA 1mM (%)	Colágeno 2ug/mL (%)
Média	65,2	55,5	74,7	63,5
Desvio Padrão (s)	4,6	4,7	4,9	4,7
2s	9,2	9,4	9,7	9,4
Limite Inferior	56,0	46,1	65,0	54,0
Limite Superior	74,4	64,8	84,4	72,9

Os resultados descritos acima permitiram a obtenção dos valores normais para a população controle (tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Variação normal da amplitude máxima de agregação plaquetária pelo método de impedância elétrica no grupo controle (n=30)

Agente Agregante	**Variação (Ω)**
ADP 10 uM	5,1 - 17
ADP 5 uM	1 - 11,6
Ácido Aracdônico 0,5 uM	6,3 - 12,4
Colágeno 1,25mg/mL	13,3 - 21,4

Tabela 7 – Variação normal da amplitude máxima de agregação plaquetária pelo método de turbidimetria

Agente Agregante	**Variação (%)**
ADP 7,5 uM	56 - 74,4
ADP 0,75 uM	46,1 - 64,8
Ácido Aracdônico 1mM	65 - 84,4
Colágeno 2 mg/mL	54 - 72,9

Na tabela 8 (em anexo) estão os resultados do estudo de agregação plaquetária nos pacientes sob uso regular do ácido acetilsalicílico.

A partir dos traçados de agregação plaquetária, fez–se a interpretação dos padrões de curva e de sua amplitude máxima obtendo-se o total de

pacientes considerados como hipoagregantes e normoagregantes, como mostrado nas tabelas 9, 10 e 11, abaixo.

Tabela 9 – Número de pacientes com hipoagregabilidade e normoagregabilidade plaquetária de acordo com interpretação da curva de agregação plaquetária nas duas metodologias (n=30)

	SANGUE TOTAL				PRP			
	ADP 5	ADP 10	COL 1,25	AA	ADP 0,75	ADP 7,5	COL 2	AA
Num de hipoagregantes	3	9	26	27	23	11	17	26
Num de normoagregantes	27	21	4	3	7	19	13	4

Tabela 10 - Porcentagem de pacientes com hipoagregabilidade plaquetária de acordo com interpretação da curva de agregação plaquetária nas duas metodologias (n=30)

	SANGUE TOTAL				PRP			
	ADP 5	ADP 10	COL 1,25	AA	ADP 0,75	ADP 7,5	COL 2	AA
Num de hipoagregantes	10	30	87	90	77	37	57	87
Num de normoagregantes	90	70	13	10	23	63	43	13

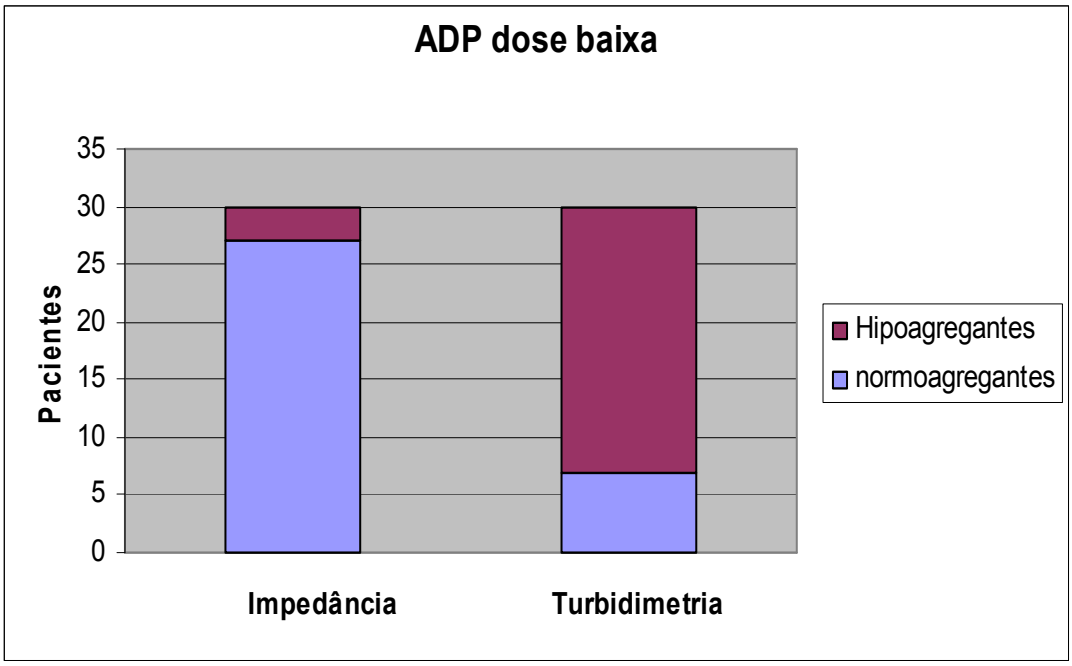
De acordo com a tabela 10 observa-se que em sangue total (impedância) houve um total de pacientes caracterizados como hipoagregantes de 10% com ADP 5µM, 30% com ADP 10 µM, 87% com colágeno 1,25mg/dL e 90% com ácido araquidônico. Na técnica turbidimétrica (PRP), analogamente, observa-se 77% com ADP 0,75 µM, 37% com ADP 7,5 µM, 57% com colágeno 2 mg/dL e 87% com ácido araquidônico.

Tabela 11 – Resultados de amplitude máxima em agregação plaquetária pelos dois métodos empregados nos pacientes em uso de ácido acetil- salicilico (n=30)

	SANGUE TOTAL				PRP			
	ADP 5	ADP 10	COL 1,25	AA	ADP 0,75	ADP 7,5	COL 2	AA
Média	4,9	7,7	8,9	3,7	34	58,8	54,1	21,4
Desvio Padrão	4,3	4,6	4,1	2,9	22,1	15,4	20,9	24,9

A partir dos dados das tabelas acima foram feitas comparações entre os diferentes agentes agregantes com relação à proporção dos resultados de hipoagregação e normoagregação, conforme mostram as figuras 9,10,11,12:

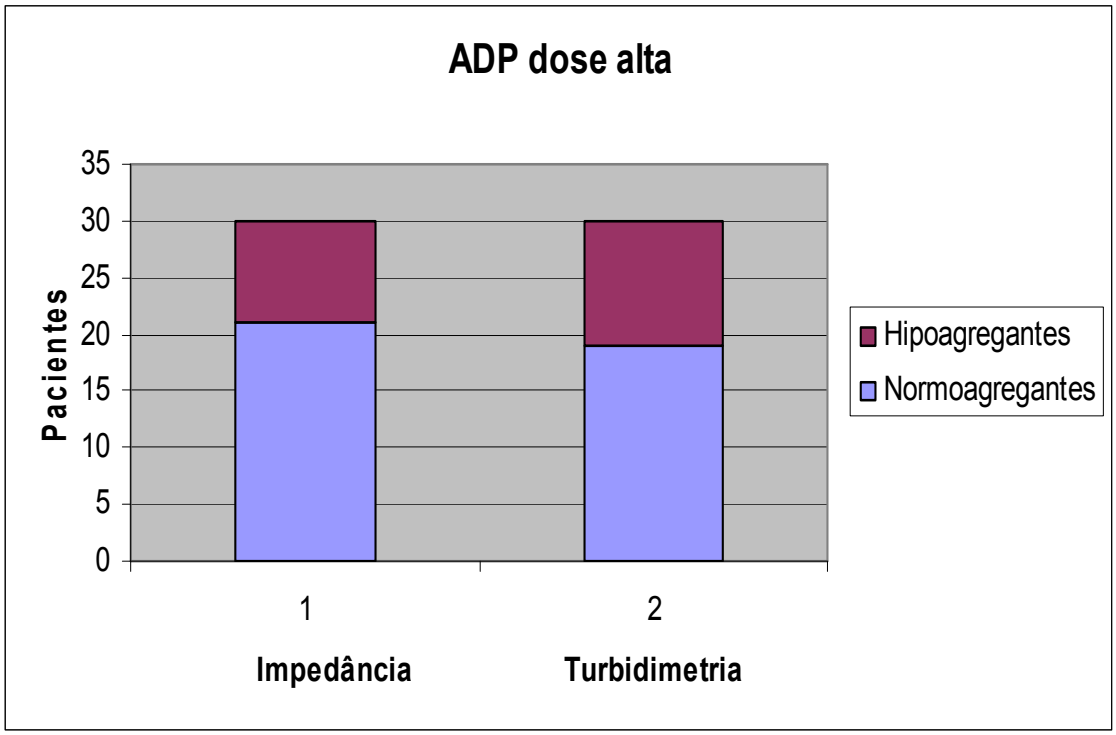
Figura 9 – Proporção de pacientes sob uso de AAS considerados hipoagregantes e normoagregantes em relação ao agente agregante ADP em dose baixa (ADP 5 – sangue total e ADP 0,75 – PRP) nas duas metodologias.



Nesse agregante, ADP em dose baixa (0,75µM no método turbidimétrico, e 5 µM no método de impedância elétrica), demonstra-se diferença estatisticamente significante na proporção de pacientes hipoagregantes (3

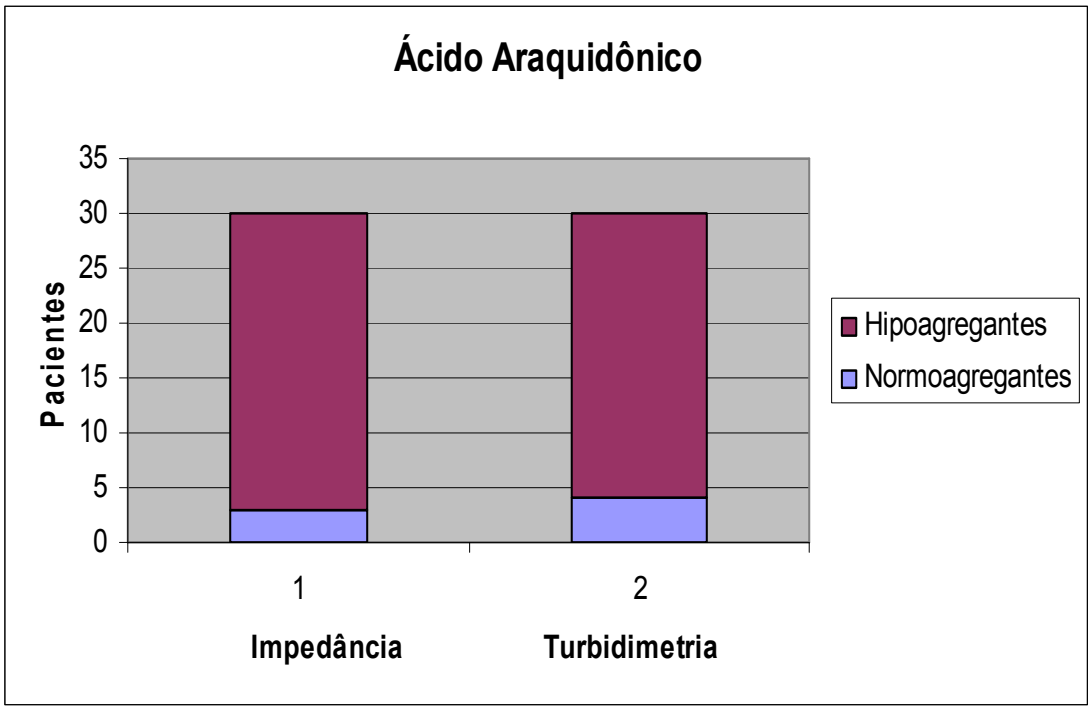
pacientes na técnica de impedância e 23 na técnica turbidimétrica) entre os dois métodos (p<0,05).

Figura 10 - Proporção de hipoagregantes e normoagregantes em relação ao agente estimulante ADP em dose alta (ADP 10 µM em sangue total e ADP 7,5 µM em PRP) nas duas metodologias



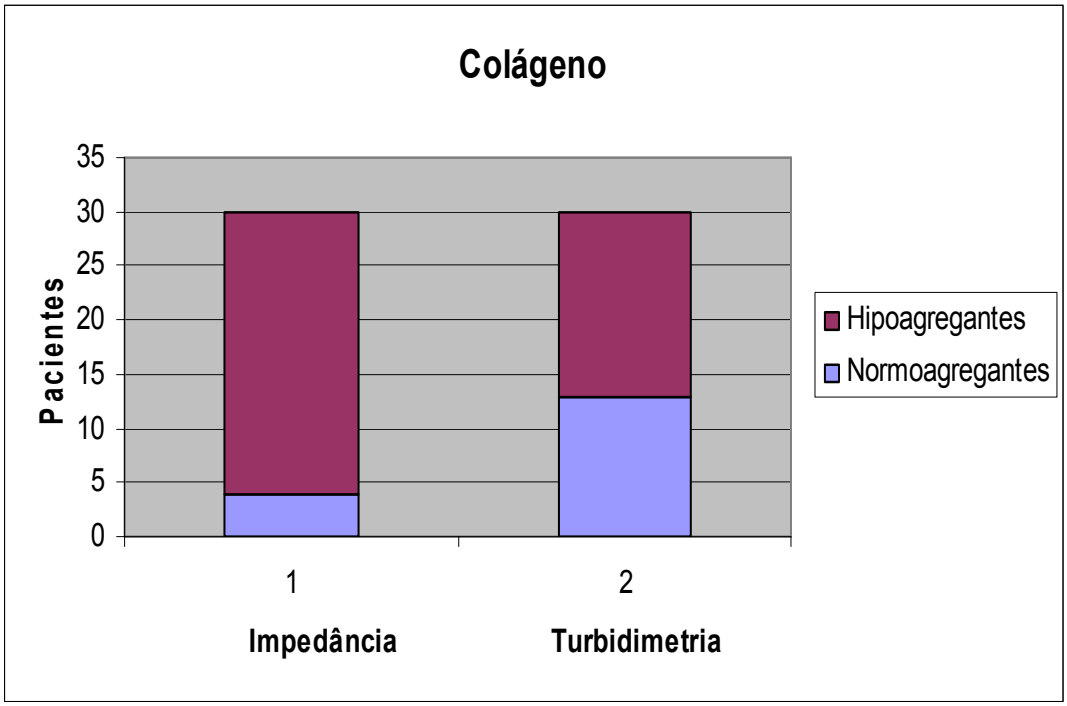
Neste agregante, ADP, em dose alta (7,5 µM no método turbidimétrico e 10 µM no método de impedância), não há diferença estatisticamente significante na proporção de pacientes hipoagregantes (9 pacientes na técnica por impedância e 11 pacientes na técnica turbidimétrica) entre os métodos (p<0,05).

Figura 11 - Proporção de hipoagregantes e normoagregantes em relação ao agente Ácido Araquidônico nas duas metodologias



No agente agregante ácido araquidônico, não há também diferenças estatisticamente significante na proporção de pacientes hipoagregantes (27 pacientes na técnica por impedância e 26 pacientes na técnica por turbidimetria) entre os métodos ($p<0,05$).

Figura 12 - Proporção de pacientes hipoagregantes e normoagregantes em relação ao agente agregante Colágeno nas duas metodologias.



Nesse agente agregante, nas concentrações clássicas de maior sensibilidade para detectar a inibição da cicloxigenase pelo ácido acetilsalicílico[20], observa-se uma maior proporção de pacientes hipoagregantes na técnica por impedância do que na turbidimétrica (26 pacientes na técnica por impedância e 17 pacientes pela técnica de turbidimetria), mostrando uma diferença estatisticamente significante entre os métodos ($p<0,05$).

5. DISCUSSÃO

Com o uso crescente da terapia a base de AAS como uma das formas de prevenção de eventos trombóticos pela atuação do fármaco na função das plaquetas, faz-se necessário um teste laboratorial capaz de monitorar a efetividade dessa terapia, além de definir o grau de inibição causado pelo AAS, ou se o mesmo já teve seu efeito finalizado para assim poder liberar o paciente para outros procedimentos clínicos diversos.

Dentro dessa premissa o teste mais utilizado em rotina laboratorial é o de agregação plaquetária por turbidimetria, que tem suas vantagens e limitações, como discutido anteriormente. Nesse trabalho foi testado e comparado com esse método, a técnica de agregação plaquetária por impedância elétrica, analisando desse modo, duas metodologias para o mesmo exame.

Nossos resultados mostraram algumas semelhanças e divergências entre as técnicas analisadas quando comparadas com os agentes agregantes utilizados.

Com o agente agregante ADP em dose baixa (figura 9) obtivemos a maior discrepância entre as metodologias, onde a técnica turbidimétrica mostrou um número de hipoagregantes (77%) significativamente menor a por impedância (10%). este resultado pode estar relacionado com a baixa força do agregante no sangue total, onde obtivemos resultados normais, no grupo controle com amplitudes máximas de onda começando com 1Ω.

Com o agente agregante ADP em dose alta (figura 10) obtivemos uma boa semelhança entre as duas técnicas, não se observando grandes divergências entre elas. Esses resultados mostram que a concentração alta do agregante tende a falsear ou minimizar os efeitos laboratoriais do AAS, provavelmente devido a uma maior estimulação dos receptores purinérgicos.

Com o agente agregante Ácido Araquidônico (figura 11) também não observamos discrepâncias significativas entre os resultados, mostrando que as duas metodologias se mostraram adequadas para se monitorar o efeito antiplaquetário do AAS. Ambas metodologias mostraram um número alto de resultados hipoagregantes, o que seria esperado quando se faz uso do fármaco. A técnica turbidimétrica mostrou um total de 87% de hipoagregantes e a por impedância, um total de 90%. Estes resultados podem colocar o agente agregante como uma importante ferramenta no controle terapêutico do fármaco, dado que com a inibição da COX pela aspirina, não há a conversão do ácido araquidônico em TXA_2.

Com o agente agregante colágeno (figura 12), nas doses clássicas utilizadas para a monitorização do fármaco[20], observamos que a metodologia por impedância obteve um número maior de hipoagregantes (86,7%) do que a técnica turbidimétrica (57%). Esses resultados estão de acordo com Hanno Riess[19], que também demonstrou a sensibilidade maior do método por impedância para esse agregante.

Como Andrzej Szczeklik[5] e colaboradores, demonstramos também a alta resposta do ácido araquidônico em impedância, mas também, alta resposta na metodologia turbidimétrica. Isso mostra que esse agente agregante é realmente um forte indicador do efeito antiplaquetario do AAS nas duas metodologias. O resultado não diferencia as técnicas, o que é um indicativo de que as duas metodologias podem ser usadas na prática laboratorial.

Com os resultados, se analisarmos todo o perfil de agentes agregantes, não apenas um em separado, podemos afirmar que as duas metodologias detectam em um ou mais parâmetros (agregantes) a inibição da COX pelo AAS, mostrando que ambas são ferramentas válidas para o monitoramento do efeito antiplaquetário do fármaco.

A agregação plaquetária por impedância pode ser utilizada em laboratórios para suprir algumas deficiências da agregação plaquetária tradicional, como a utilização de menores quantidades de sangue coletado, fato extremamente importante em idosos, obesos, pacientes sub-nutridos, crianças e recém-nascidos, cuja dificuldade de coleta é maior.

Pode também resolver outros importantes interferentes da agregação plaquetária por turbidimetria, como amostras hemolisadas, ictéricas e lipêmicas. Esses interferentes são causas importantes de rejeição de amostras, o que pode atrapalhar o tratamento clínico. Com a utilização da agregação plaquetária em impedância essa interferência é eliminada, ajudando o clínico a ter os resultados e melhorar a terapia do paciente.

Outra vantagem da agregação plaquetária por impedância é em relação a contagem de plaquetas do paciente. A agregação plaquetária por turbidimetria não é realizada de maneira satisfatória com amostras cujas contagens plaquetárias são inferiores a 90.000 plaquetas/mm3, ao passo que na impedância esse limite cai para 50.000 plaquetas/mm3[14]. Essa diferença é particularmente importante quando se fala em realizar o teste em pacientes oncológicos, hepatopatas ou portadores de outras patologias que causam plaquetopenias.

Por utilizar um meio mais parecido com o que ocorre *in vivo*, a agregação plaquetária por impedância pode ter uma influência maior para definir os resultados, uma vez que não perde elementos celulares importantes no processo de formação do trombo, como as hemácias, os leucócitos com suas interações quimiotáticas, a viscosidade sanguinea, e as altamente reativas plaquetas gigantes, principalmente em estados inflamatórios, por exemplo, nos casos de ruptura de placas arteroscleróticas.

Como em saúde atualmente o fator tempo é de considerável importância no diagnóstico e acompanhamento médico, deve-se ressaltar a importância de novos métodos de monitorização. E nesse campo podemos colocar a agregação plaquetária por impedância, devido ao tempo mais curto para se realizar o teste. Podendo o exame ser liberado mais rápido, sendo interessante tanto para o clínico que terá resultados mais rápidos, tanto para o laboratório,

que não precisa dispor de um funcionário por mais tempo para realizar um exame.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o método de impedância elétrica pode ser utilizado em rotina laboratorial em substituição, ou em complementação, com a metodologia turbidimétrica para monitorar a terapia antiplaquetária a base de ácido acetilsalicílico.

Anexo A – Tabelas de resultados de amplitudes máximas de ondas de agregação plaquetária

Tabela 2 - Resultada de amplitude máxima obtida para a agregação plaquetária em impedância elétrica para os 30 doadores normais (n=30)

AMOSTRA	ADP 10 µM Ω	ADP 5 µM Ω	Ác. Arac. 0,5 µM Ω	Colágeno 1,25mg/mL Ω
1	10	4	19	21
2	16	14	19	19
3	9	3	19	24
4	14	10	13	18
5	12	6	10	17
6	16	4	12	18
7	15	9	14	19
8	14	4	14	17
9	13	5	13	19
10	14	4	13	17
11	7	2	9	15
12	11	4	12	17
13	10	3	13	18
14	9	2	12	15
15	13	9	16	20
16	10	4	12	17
17	7	2	13	16
18	6	2	7	16
19	11	10	10	16
20	11	8	8	18
21	12	9	10	17
22	8	4	12	15
23	9	3	11	16
24	10	5	9	16
25	15	8	9	14
26	12	2	11	16
27	6	3	14	19
28	8	3	12	17
29	9	3	11	16
30	15	9	14	18

Tabela 4 - Resultados de amplitude máxima obtida em agregação plaquetária por turbidimetria no 30 doadores normais (n=30).

AMOSTRA	ADP 7,5uM (%)	ADP 0,75uM (%)	Ácido Aracdônico 1mM (%)	Colágeno 2mg/mL (%)
1	63	55	71	65
2	67	56	70	62
3	61	50	83	71
4	59	51	73	67
5	63	55	75	62
6	60	51	72	58
7	66	55	79	70
8	70	56	82	67
9	69	58	70	60
10	67	54	69	73
11	64	51	79	67
12	69	60	74	67
13	68	56	65	70
14	63	54	68	62
15	70	56	69	63
16	67	60	73	70
17	62	49	70	63
18	72	65	75	69
19	55	45	75	54
20	64	60	72	56
21	73	68	81	61
22	62	50	80	66
23	77	60	79	59
24	68	55	76	60
25	62	59	79	60
26	63	55	73	62
27	61	55	86	60
28	60	51	76	59
29	66	59	75	59
30	65	55	72	62

Tabela 8 – Comparativo de resultados de amplitude máxima entre as duas metodologias para os 30 pacientes estudados

Pacientes	SANGUE TOTAL(Ω)				PRP(%)			
	ADP5	ADP10	COL 2	AA	ADP1	ADP 7,5	COL 2	AA
1	1	2	7	3	2	63	80	60
2	2	5	13	4	42	55	60	70
3	2	8	7	3	30	60	40	13
4	9	10	4	0	40	50	40	10
5	5	2	3	0	40	65	40	5
6	5	2	8	0	12	45	25	15
7	0	7	16	4	9	45	50	5
8	17	16	16	8	58	85	90	5
9	0	18	8	5	1	49	66	0
10	8	6	5	4	55	60	50	15
11	8	9	1	7	40	60	35	66
12	1	5	9	0	12	45	25	15
13	3	8	9	7	35	75	30	20
14	4	8	12	3	53	60	80	9
15	2	4	13	12	15	51	65	10
16	5	7	12	4	49	60	90	10
17	3	9	14	7	70	80	60	66
18	4	8	13	3	75	88	70	90
19	9	10	8	4	2	8	37	5
20	4	7	10	3	45	61	40	10
21	1	2	7	3	2	63	80	60
22	2	8	7	3	30	60	40	13
23	5	2	3	0	40	65	40	5
24	9	10	4	0	40	50	40	10
25	5	2	8	0	12	45	25	15
26	17	16	16	8	58	85	90	5
27	4	7	10	3	45	61	40	10
28	8	6	5	4	55	60	50	15
29	0	18	8	5	1	49	66	0
30	4	8	12	3	53	60	80	9

Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:.....…..... Nº…..... APTO: ..... BAIRRO:..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) ....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO:..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em relação a pacientes sob terapia antiplaquetária a base de ácido acetil salicílico.

2. PESQUISADOR : Leonardo Lorenzo da Silva

CARGO/FUNÇÃO: Farmacêutico-Bioquímico

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL de FARMÁCIA SP Nº 33.475

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Coagulação – Serviço de Hematologia - ICHC

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Pessoas como você tomam o ácido acetil salicílico, ou AAS, com a finalidade de diminuir a ação das plaquetas, que são pequenas células do sangue responsáveis por alguns casos de trombose. Muitas vezes existe a necessidade de se saber se o ácido acetil salicílico está funcionando de maneira adequada e para isso se faz um exame de sangue, chamada agregação plaquetária. Este trabalho será realizado com a finalidade de avaliar e comparar duas diferentes técnicas laboratoriais de agregação das plaquetas: a agregação plaquetária por turbidimetria, feita em plasma rico em plaquetas, e por impedância elétrica, realizada em sangue total.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Após seu consentimento, você fará uma punção venosa, em geral na veia localizada na dobra do cotovelo, a fim de ser coleta amostra de sangue para a realização dos testes de agregação plaquetária. Serão coletados aproximadamente 15 mL de sangue, que serão colocados em 3 tubos de material plástico, contendo um anticoagulante específico. A coleta será feito após limpeza adequada do local onde será feita a punção e empregado-se agulhas descartáveis.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Como foi esclarecido anteriormente serão feitos dois testes laboratoriais diferentes, que avaliam o mesmo acontecimento, ou seja a agregação plaquetária. Para isso, você deverá fazer uma punção de uma veia periférica, localizada na dobra do cotovelo, para a obtenção das amostras de sangue que serão analisadas.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: para a coleta das amostras, com o uso de material descartável, você sentirá dor de pequena intensidade decorrente da picada da agulha. Em algumas pessoas poderá

ser observado, posteriormente aparecimento de um pequeno hematoma(mancha arroxeada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana.

5 – Benefícios para o participante: No final desse estudo, depois da análise dos resultados, todos os pacientes que usam o AAS e que precisam de uma avaliação do seu efeito e fazem o acompanhamento com o teste de agregação plaquetária convencional, podem, com a nova metodologia, ter menos tubos (material) coletados e resultados mais rápidos.

6 – Em qualquer momento do estudo você poderá ter esclarecimentos de qualquer dúvida que você tenha sobre esse trabalho. O principal investigador é o Dr. Leonardo Lorenzo da Silva, que poderá ser encontrado no endereço Avenida Enéas de Carvalho de Aguiar, 155 – 1ª andar, telefone 3061-5544 ramal 287. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7 – Em qualquer momento desse trabalho você poderá deixar de participar do estudo, sendo que caso isso ocorra você continuará tendo o mesmo acompanhamento pelos médicos , bem como seu tratamento não sofrerá qualquer alteração.

8 – Todas as informações obtidas serão analisadas em conjunto com as dos outros pacientes, sendo que nunca será divulgada a identificação de qualquer pessoa que participar do estudo.

9 – Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados do trabalho ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10 – Você não terá nenhuma despesa financeira para participar desse trabalho e também você não receberá nenhum pagamento por sua participação.

11 - Os dados e o material que serão coletados neste trabalho serão usados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ”Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em relação a pacientes sob terapia antiplaquetária a base de ácido acetil salicílico”
Eu discuti com o Dr. Leonardo Lorenzo da Silva sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Leonardo Lorenzo da Silva

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

REFERÊCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sudo T., Ito H., Ozeki Y., Kimura Y. Estimation of anti-platelet drugs on human platelet aggregation with a novel whole blood aggregometer by a screen filtration pressure method. *British Journal of Pharmocology* (2001) 133, 1396-1404.

2. ISIS-2(Second Internation Study of Infarct Survival). Colaborative group. Randomised trial of intravenousstreptokinase, oral aspirin, both, or neither among. 17, 187cases of suspected acute myocardial infarction. ISIS-2. *Lancet*, 1988,2,349-360.

3. Margaret L. R., Roland L., Marian A. P. Platelet function assays. *Tranfusion and Apheresis Science* 28 (2003) 307-317.

4. Serebruany V.L., McKenzie M.E., Meister A.F., Fuzaylov S.Y., Gurbel P.A., Atar D., Gattis W.A., O'Connor C.M. Whole blood impedance aggregometry for the assessment of platelet function in patirnts with congestive heart failure (EPCOT Trial). *The European Journal of Heart Failure* 4 (2002) 461-467.

5. Szczeklik A., Musiat J., Undas A., Sanak M., Nizankowski R. Aspirin resistance. *Pharmacological Reports* (2005) 57, suppl, 33-41.

6. Hillarp A, Lethagen S, Mattiassoni I. Aspirin resistance is not a common biochemical phenotype explained byunblocked cyclooxygenase-1 activity. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 196–197.

7. Hart RG, Leonard AD, Talbert RL, Pearce LA, Cornell, E, Bovill E, Feinberg WM. Aspirin dosage and thromboxane synthesis in patients with vascular disease. *Pharmacotherapy*,2003, 23, 579–584

8. Marshall Lichtman, Ernest Beutler, Kenneth Kaushansky, Thomas Kipps, Uri Seligsohn, Josef Prchal. *Williams Hematology* . 2005, 7th Edition.

9. Laffan M., Manning R. Investigation of haemostasis. Dacie & Lewis's. *Practical Haematology* . pags 379-386. 2006.

10. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb. Haemost. 82:352, 1999*

11. Offermans S. The role of heterotrimetric G proteins in platelet activation. *Biol Chem* 381:389, 2000

12. Abrams CS. Platelet biology. *Uptodate* 2008

13. C. Patrono, C. Baigent, J. Hirsh, G. Roth. Antiplatelet drugs. *Chest*, june 2008 .

14. John Eikelboom, MBBS, MSc; Mark Feldman, MD: Shamir R. Mehta, MD, MSc; Alan D. Michelson, MD; John A. Oates, MD; Eric Topol, MD. Aspirin Resistance and Its Implications in Clinical Practice. *MedGenMed*. 2005.

15. H.P. Rang , M. M. Dale , J. M. Ritter . *Farmacologia*. 6º edição. 2007.

16. Farrel B., Godwin J., Richards S., et al. The United Kingdom transient ischemic attack aspirin trial: Final results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54: 1044-1054

17. Kitchen S., McCraw A. Diagnosis of Haemophilia and Others Bleeding Disorders . *World Federation of Hemophilia*. 2002

18. Margaret L. R., Roland L., Marian A. P. Platelet function assays. *Tranfusion and Apheresis Science* 28 (2003) 307-317.

19. Riess H., Braun G., Brehm G., Hiller E. Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. *Am J Clin Pathol.* 1986 .

20. Mackie I.J., Jones R., Machin S.J. Platelet impedance aggregation in whole blood and its inhibition by antiplatelet drugs. *Journal of Clinical Pathology* 1984; 37: 874-878

21. Weyne G.R.S. Determinação do tamanho da amostra em pesquisas experimentais na área da saúde. *Arq.Med*. ABC 2004; v.29; n°2

22. Botter D.A., Paula G.A., Leite J.G., Cordani L.K. Noções de estatística. *Instituto e Matemática e Estatística – USP*. 1996

23. Secretaria Estadual de Saúde-SP. *Critérios para doação*. Disponível em http://www.saude.sp.gov.br/content/hemorede_criterios_doacao.mmp

24. Fundação Pró-Sangue-SP. *Quem não pode doar*. Disponível em http://www.prosangue.sp.gov.br/prosangue/actiondoacao.do?acao=quempode

25. Clinical and laboratory standard institute (CLSI) *Defining, estabilishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline*. Clinical and laboratory standard institute 3th edition. 2008