

Artigo Original

Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue**Analysis of the waves and aggregation patterns in patients with cardiovascular diseases in using acetylsalicylic acid compared blood donors**

Patrícia S. M. Bernardi¹
Haroldo W. Moreira²

A agregação plaquetária avalia a função das plaquetas através de diferentes vias de ativação plaquetária *in vitro*, fornecendo traçados de ondas equivalentes à propriedade física dessa agregação. Sabendo-se que a aspirina acetila irreversivelmente a enzima cicloxigenase prevenindo a geração de tromboxana A₂, potente ativador da agregação plaquetária, esta droga tem sido analisada há mais de trinta anos na clínica médica em pacientes com doenças cardiovasculares como uma potente droga antitrombótica. Foram nossos objetivos obter traçados de ondas correspondentes às fases da agregação plaquetária para nossa padronização utilizando nosso grupo controle de doadores de sangue e compará-las com nosso grupo estudo, frente a diferentes agentes agonistas em diferentes concentrações: ADP 1 µM e 3 µM; AA, 0,5 mM; ADR, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0,010 mg/mL. Os grupos analisados foram constituídos por 41 cardíacos e 40 doadores de sangue considerados controle. Dos cardíacos, 33 faziam uso regular do AAS na concentração de 200 mg/dia e oito na concentração de 100 mg/dia, sendo todos considerados hipertensos. A padronização da agregometria estava na dependência do encontro de traçados correspondentes a ondas de agregação, sendo esses obtidos em porcentagem no tempo de cinco minutos estandarizados pelo aparelho utilizado. Comparando os resultados entre os pacientes e o grupo controle, foi possível observar que, na presença dos agentes agregantes ADP 1 µM e ADP 3 µM, ADR 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0,010 mg/mL, os pacientes apresentaram 1ª onda, mas não 2ª onda. Por sua vez, no caso do AA 0,5 mM não houve o encontro de traçados de ondas. Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(4):239-244.

Palavras-chave: Fases da agregação plaquetária; ácido acetil salicílico; doenças cardiovasculares.

Introdução

A agregação plaquetária ocorre devido à formação de pontes de fibrinogênio, pois este se liga ao receptor na membrana plaquetária, GP IIb/IIIa, que na presença do

Ca⁺⁺ forma um complexo estável na superfície das plaquetas ativadas. Essa também ocorre devido ao metabolismo do ácido aracdônico, sendo o mesmo liberado a partir da membrana fosfolípídica das plaquetas pela ativação da enzima fosfolipase A2 e, subseqüentemente, a

¹Mestre em Análises Clínicas pelo Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da FCF – Unesp.

²Professor Titular em Hematologia Clínica da Disciplina de Hematologia Clínica do Depto. de Análises Clínicas da FCF – Unesp, Araraquara.

Correspondência para: Haroldo W. Moreira
Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp
Caixa postal 502 – 1481-902 – Araraquara-SP, Brasil
E-mail: hmoreira@fcfar.unesp.br

enzima cicloxigenase (COX-1) converte o ácido aracdônico em endoperóxidos cíclicos. Esses são então convertidos pela tromboxana sintetase à tromboxana A₂ (TXA₂), funcionando como um potente agonista que induz a agregação. As células endoteliais também possuem essa via do metabolismo do ácido aracdônico, entretanto, as células preferencialmente convertem endoperóxidos cíclicos em prostaciclina (PGI₂), um importante inibidor da agregação plaquetária.¹⁻⁷

O uso da aspirina como uma potente droga anti-trombótica tem sido analisada há mais de trinta anos na clínica médica em pacientes que fazem uso da mesma, visto que este medicamento acetila irreversivelmente a enzima COX-1 prevenindo a geração de tromboxana A₂ (TXA₂), um potente ativador da agregação plaquetária. O papel da adenosina difosfato como o principal estimulador da agregação plaquetária foi descoberto por outros importantes pesquisadores, assim como as propriedades de agregação do colágeno e trombina, a reação de liberação e o metabolismo do ácido aracdônico.⁵⁻⁸

A amplificação e propagação contínua da agregação plaquetária é ativada pela formação de agregados plaquetários e a expulsão de ADP e de outras substâncias ativas das organelas plaquetárias. Antes, ou ao mesmo tempo da reação de liberação, tem-se uma primeira alteração estrutural bem definida nas plaquetas ativadas, representada por uma transformação do formato discóide para esferas espinhosas com protusões ou filópodes, sendo esta considerada como a primeira e reconhecida mudança no formato plaquetário. Isso ocorre devido à ativação do sistema contrátil da plaqueta, sendo que alguns pesquisadores a consideram uma etapa distinta na função plaquetária. Experimentos *in vitro* e sob condições controladas evidenciaram que a mudança no formato da plaqueta, bem como a fase inicial da agregação, precede a reação de liberação, embora a seqüência exata dos eventos *in vivo* ainda não tenha sido elucidada. A isso, segue-se a ativação ou disponibilidade do fator 3 plaquetário (PF-3) e outras substâncias pró-coagulantes, com o início da hemostasia secundária da coagulação, levando à consolidação da rolha plaquetária pela fibrina, com subsequente retração do coágulo.^{3,9,10,11}

A agregação plaquetária é um teste que avalia a função das plaquetas pela exploração de diferentes vias de ativação plaquetária *in vitro*, quando um plasma citratado rico em plaquetas (PRP) é continuamente agitado por uma esfera de ferro em um aparelho denominado agregômetro de plaquetas. Esse aparelho mede uma combinação de absorção e dispersão de luz, tendo-se hoje aparelhos que permitem tanto medições nefelométricas, quanto fotométricas. Constitui um processo que registra alterações na transmissão da luz, pois, ao adicionar agentes agonistas, tem-se um decréscimo da mesma devido à mudança na forma das plaquetas, que passam de discóides a esféricas.

Isto é seguido de um aumento gradual na transmissão de luz, devido à agregação das plaquetas, o que torna o meio mais claro. Este teste é válido para mostrar o defeito da hemostasia primária, quando se suspeita da história clínica do paciente e na presença de um prolongamento do tempo de sangramento.¹²⁻¹⁸

Dessa forma, o agregômetro permite mensurar parâmetros temporais, semiquantitativos e qualitativos na agregação *in vitro*. A resposta das plaquetas a vários agentes agregantes como adenosina difosfato (ADP), colágeno, adrenalina (ADR), trombina e ácido aracdônico (AA) pode ser quantificada no plasma rico em plaquetas ou no sangue total. Comparativamente aos outros testes que avaliam a hemostasia primária, essa técnica parece representar o melhor auxílio diagnóstico laboratorial na verificação dos distúrbios qualitativos adquiridos ou congênicos das plaquetas.¹⁸

A agregação plaquetária exibe uma resposta bifásica de uma agregação reversível (1ª onda ou agregação primária), seguida de uma agregação irreversível (2ª onda ou agregação secundária), que ocorre devido à desintegração das plaquetas associada com, mas não necessariamente, a consequência da reação de liberação.^{3,18-21}

Os agentes primários, como, por exemplo, adenosina difosfato, adrenalina, noradrenalina, serotonina, vasopressina e trombina são capazes de iniciar a agregação plaquetária diretamente por mecanismos que não dependem da produção de prostaglandinas ou da liberação de ADP contido nas plaquetas. Já os agregantes secundários, como, por exemplo, acetilcolina, araquidonato, ácidos graxos, fator de agregação plaquetária, agentes infecciosos e seus produtos produzem a agregação pela indução da liberação de ADP e/ou produção de prostaglandinas e metabólitos relacionados com as plaquetas.³

No presente trabalho foi nosso propósito obter traçados de ondas de agregação plaquetária para nossa padronização utilizando nosso grupo controle de doadores de sangue e compará-las com nosso grupo estudo, frente a diferentes agentes agonistas em diferentes concentrações.

Casística e métodos

Os grupos analisados foram constituídos por 41 pacientes cardíacos e por 40 doadores de sangue considerados como nosso grupo controle. Dos pacientes cardíacos, 33 faziam uso regular do AAS na concentração de 200 mg/dia e oito pacientes na concentração de 100 mg/dia, sendo todos considerados hipertensos, por especialistas clínicos.

Do primeiro grupo, 12 eram do sexo masculino e 21 do sexo feminino, com faixa etária variando dos 46 aos 88 anos. Do segundo grupo, sete eram do sexo feminino e um do masculino, com faixa etária variando dos 57 aos 84 anos.

Entre os doadores de sangue a faixa etária variava dos 18 aos 49 anos, sendo dez do sexo feminino e trinta do sexo masculino.

Para a realização da agregação plaquetária foram coletados 18 mL de sangue total por punção venosa, sendo este coletado em seringas plásticas de 20 mL e transferidos para quatro tubos de 4,5 mL siliconizados a vácuo contendo anticoagulante citrato de sódio tamponado a 0,109 M.

A agregação plaquetária foi verificada em agregômetro da marca NET LAB 2020 duplo canal, estandarizado na temperatura de 37° C, frente a agentes agonistas.

A agregação plaquetária foi realizada dentro das quatro horas após a coleta do sangue, sendo primeiramente obtido o plasma rico em plaquetas (PRP) por centrifugação a 40 g durante dez minutos e depois o plasma pobre em plaquetas (PPP) por centrifugação a 750 g durante quinze minutos em centrífuga de 8,5 cm de raio. O PRP foi transferido com cuidado sem encostar a ponteira na parede do tubo e em seguida realizada a contagem de plaquetas, sendo estas corrigidas para 250.000 plaquetas/mm³. Após a correção, foi realizada a verificação da agregação frente aos agentes agonistas em diferentes concentrações: ADP 1µM e 3 µM; AA, 0,5mM e ADR, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0,010 mg/mL.

A padronização da agregação plaquetária foi realizada com a utilização de quatro *pools* diferentes, constituído cada um de plasma de dez doadores de sangue, obtidos em dias diferentes e realizada a observação em agregômetro estandarizado em fornecer curva dentro dos cinco primeiros minutos de agregação.²²

Resultados e discussão

A padronização da agregometria estava na dependência do encontro de traçados correspondentes a ondas de agregação nas nossas condições laboratoriais. Além dessas ondas que poderiam ser indicativas do processo agregação, desagregação e nova agregação (fornecendo primeira e segunda onda, ou seja, uma resposta bifásica) ou fusão dessas ondas (representando um perfil monofásico) ou agregação e desagregação (com o aparecimento de apenas uma onda primária), podemos obter o resultado da agregação final em porcentagem no tempo de cinco minutos estandarizados pelo aparelho.

Do mesmo modo foi nosso propósito realizar a agregação em aparelho automático estandarizado na temperatura de 37° C, já que a temperatura influencia na agregação e desagregação, sendo que a 20° C a agregação é menor que a 37° C e o ADP não causa agregação a 0° C, exceto quando usado em altas concentrações.¹¹

Vários inibidores da agregação plaquetária têm sido estudados demonstrando a importância e ação de diferentes compostos em promover essa agregação, quer seja *in vivo* ou *in vitro*. Apesar de existirem numerosos produtos que podem ser avaliados como promotores da agregação plaquetária *in vitro*, podemos destacar o ADP, a ADR e o AA, principalmente se considerarmos o propósito de analisarmos pacientes que fazem uso do AAS.¹¹ O ADP tem sido considerado o principal causador da mudança na forma da plaqueta, sendo essa essencial para que as mesmas sejam capazes de aderir umas às outras.¹³

Estudos em diferentes espécies de mamíferos indicam que o ADP induz a agregação plaquetária em PRP citratado ou heparinizado e que o cálcio é necessário na agregação.¹¹ Isto justifica, o uso de plasma citratado e rico em plaquetas na realização da agregação plaquetária.

Dessa forma, quando utilizado ADP nas concentrações de 1µM e 3 µM, foi observado na concentração de 1 µ M uma resposta bifásica, enquanto para a concentração de 3 µM uma resposta com primeira e segunda onda integradas (Figura 1), dados estes concordantes com Zucker,¹⁸ Guerra e colaboradores,²³ e Kanayama.²²

Zucker¹⁸ afirma que uma concentração entre 1 µ M e 2 µM de ADP resulta em uma agregação bifásica, sendo que a segunda onda está associada à secreção dos grânulos densos das plaquetas. Ambos, segunda onda de agregação e secreção, dependem da formação de endo-

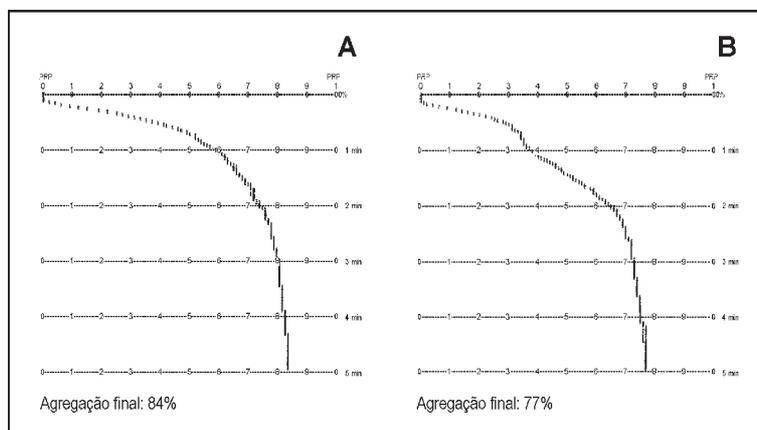


Fig. 1 – Curvas de agregação plaquetária; A- Ondas integradas (monofásica) induzida por adenosina difosfato na concentração de 3µM; B- Onda bifásica induzida por adenosina difosfato na concentração de 1µM

peróxidos e tromboxana A₂ (TXA₂), a partir do ácido aracônico e da secreção do ADP dos grânulos densos. Ocorre fusão das duas fases quando da utilização de alta concentração de ADP, o que pode ser visualizado na figura 1.

Segundo Guerra e colaboradores,²³ e Kanayama,²² ao expor as plaquetas ao ADP, este se une aos receptores específicos na membrana plaquetária, causando a ativa-

ção da plaqueta, resultando na liberação do AA, dos fosfolípidos da membrana através da ativação das fosfolipases e da metabolização a TXA_2 , com conseqüente contração e liberação do conteúdo plaquetário ao meio. As plaquetas, ao serem estimuladas com ADP, fornecem uma curva de agregação induzida bifásica, sendo a primeira onda um processo que envolve a formação de pontes de fibrinogênio entre as plaquetas. A segunda onda corresponde à fase de secreção ou liberação do conteúdo dos grânulos. Normalmente com ADP 1 μM , podemos observar as duas curvas e com ADP 3 μM , não podemos

ças na forma ou agregação primária, mas sim uma agregação secundária, sendo esta acompanhada de mudanças na forma plaquetária.^{11,18}

A agregação induzida pela adrenalina segundo Guerra e colaboradores,²³ e Kanayama,²² ocorre pois esta estimula os receptores alfa adrenérgicos, de forma a inibir a adenilciclase, reduzindo a concentração de AMP cíclico intraplaquetário e também imobiliza o cálcio ionizado das organelas ativando as plaquetas, levando à liberação do ácido aracdônico endógeno com formação de TXA_2 , contração e secreção plaquetária. A curva de agregação

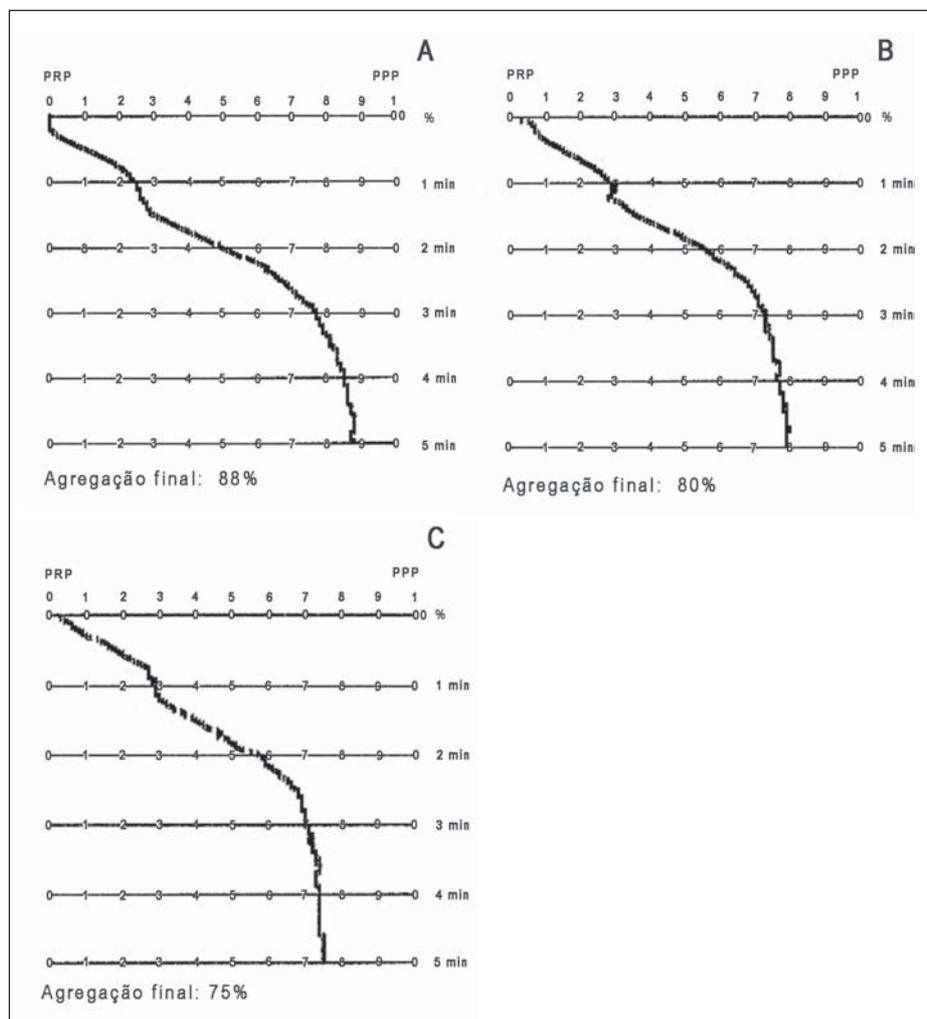


Fig. 2 – Curvas de agregação plaquetária
A- Onda bifásica induzida por adrenalina na concentração de 0,05mg/mL
B- Onda bifásica induzida por adrenalina na concentração de 0,025 mg/mL
C- Onda bifásica induzida por adrenalina na concentração de 0,010 mg/mL

distinguir a primeira da segunda onda, como evidenciado na figura 1. No caso do uso da ADR, utilizada nas concentrações de 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0,010 mg/mL, obteve-se para todas essas concentrações uma agregação bifásica (Figura 2).

A ADR causa agregação plaquetária no plasma citratado rico em plaquetas, sendo que em baixas concentrações fornece uma resposta bifásica e libera ADP das plaquetas, potencializando sua ação. Não causa mudan-

induzida por esse agregante é bifásica como no caso do ADP, correspondendo a primeira onda à fixação do fibrinogênio ao complexo de glicoproteínas IIb/IIIa da membrana plaquetária e a segunda onda à formação de TXA_2 e secreção plaquetária.

O ácido aracdônico para causar agregação depende da transformação da cicloxigenase a endoperóxidos e TXA_2 , sendo entretanto totalmente inibido por anti-inflamatórios não esteroidais que inibem a cicloxigenase.¹⁸

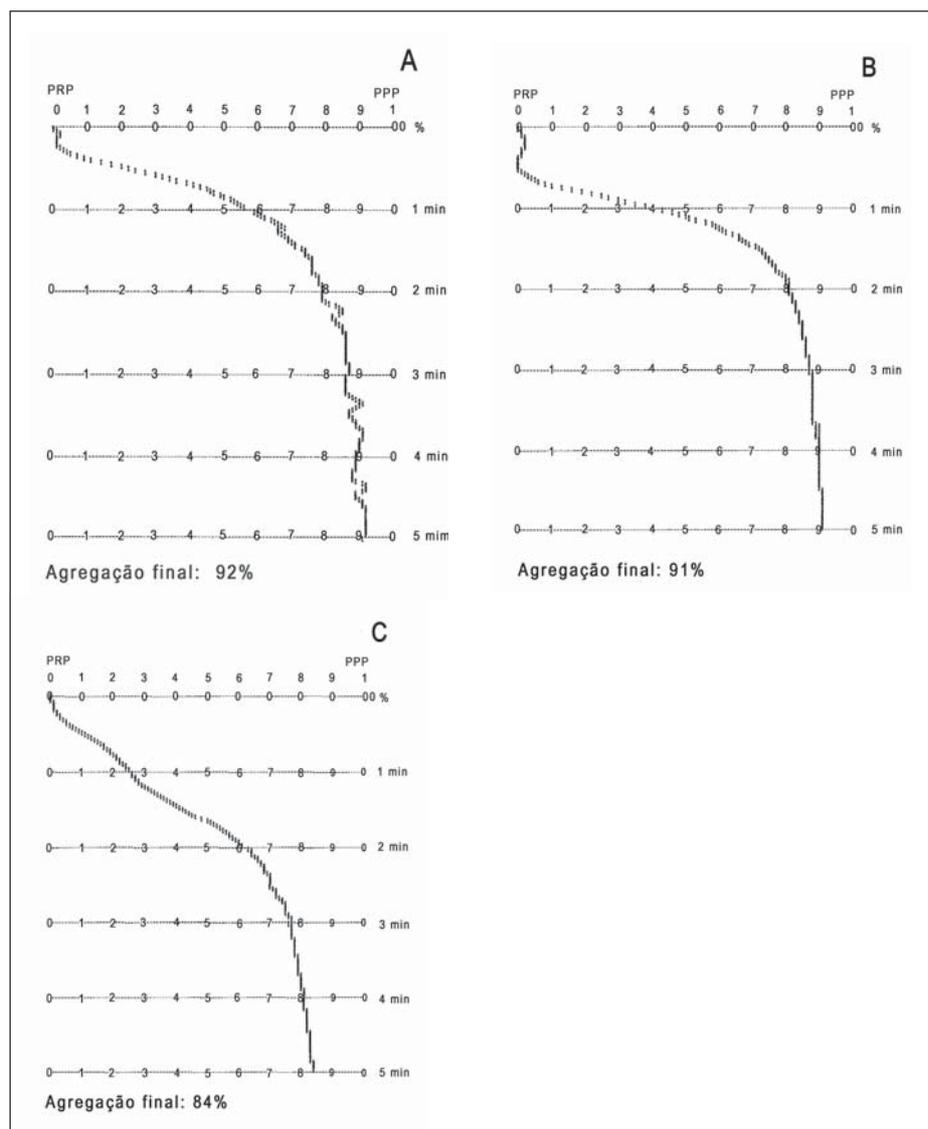


Fig. 3: Curvas de agregação plaquetária
A- Ondas integradas (monofásica) induzida por ácido aracdônico na concentração de 1,5mM.
B- Ondas integradas (monofásica) induzida por ácido aracdônico na concentração de 1,0mM.
C- Onda bifásica induzida por ácido aracdônico na concentração de 0,5mM.

No caso do ácido aracdônico (AA), utilizado na padronização nas concentrações de 1,5 mM, 1,0 mM e 0,5 mM, foi obtido uma resposta monofásica para as concentrações de 1,5 e 1,0 mM, enquanto para a concentração de 0,5 mM foi observada claramente uma resposta bifásica (Figura 3).

A opção de utilizar o AA como agente agregante em estudo de pacientes que utilizavam o AAS, foi para observar se realmente esse medicamento estava tendo o efeito inibitório de acetilar irreversivelmente a COX-1, prevenindo a geração de TXA₂, um potente ativador da agregação plaquetária, visto que, o AA causa agregação dependendo da transformação da COX-1 a endoperóxidos e TXA₂.¹⁸

No caso dos nossos pacientes analisados em ambas as concentrações de AAS 100 mg/dia e 200 mg/dia, comparando-os com nosso grupo controle utilizado na padronização, foi possível observar que na presença dos agen-

tes agregantes ADP 3 µM; ADR 0,05 mg/mL, 0,025mg/mL e 0,010 mg/mL os pacientes apresentaram 1ª onda mas não 2ª onda. Por sua vez para o AA 0,5 mM não houve o encontro de traçados de ondas.

O estabelecimento da padronização para a realização da agregação plaquetária pôde permitir estipular valores de referências válidos para o nosso equipamento e nossas condições laboratoriais, frente à ação de diferentes agentes agregantes, concentrações e frente à ausência do agente agregante.

Abstract

Platelet aggregation illustrates the function of the platelets by different ways of in vitro platelet activation providing wave traces equivalent to the physical proprieties of this aggregation. It is well known that aspirin irreversibly blocks the cyclooxygenase

enzyme preventing the release of thromboxane A_2 , a potent activator of platelet aggregation. This drug has been evaluated for more than thirty years as a potent antithrombotic drug in patients with cardiovascular diseases. Our objective was to obtain wave traces corresponding to platelet aggregation phases for standardization purposes using blood donors as a control group and comparing the results with a study group using different agonistic agents at different concentrations: ADP 1 μ M and 3 μ M; AA 0.5 mM and ADR at 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL and 0.010 mg/mL. The analyzed groups were composed of 41 cardiac patients and 40 blood donors. Among the cardiac patients, 33 regularly used 200 mg of ASA per day and 8 patients normally used 100 mg of ASA per day, all of whom were considered hypertensive. The pattern of aggregation was dependent on conjunction traces corresponding to aggregation waves. A percentage at 5 minutes was obtained with these traces established by the equipment used. In our work, comparing the results among analysed patients and the control group, it was possible to observe that in the presence of the aggregating agents ADP 1 μ M and ADP 3 μ M; ADR 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL and 0.010 mg/mL the patients showed the first wave but no second wave aggregation. However, in respect to AA 0.5 mM the conjunction of the trace waves was not seen. Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(4):239-244.

Key words: Phases of platelet aggregation; acetylsalicylic acid; cardiovascular diseases.

Referências Bibliográficas

- Andrews RK, Shen Y, Gardiner EG et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost* 1999;82:357-364.
- Becker RC. Thrombosis and the role of the platelet. *Am J Cardiol* 1999;83(9A):3-6.
- Bithell TC. A fisiologia da hemostasia primária. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J et al. *Wintrobe: hematologia clínica*. São Paulo: Manole, 1998a. v. 1, cap. 18, p.587-614.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3.627-3.661.
- Gaetano G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Haematologica* 2001;4:349-356.
- Gordon, M. Drugs that influence coagulation: drugs and blood coagulation. In: $\frac{3}{4}$ *Pharmacology 2000: medical pharmacology and disease - based integrated instruction*. Kansas: University of Kansas School of Medicine, 2003. cap. 39. Disponível em: <http://www.pharmacology2000.com/Coagulation/coag1.htm>. Acesso em: 29 mar. 2003.
- Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem* 2000;46(8 B):1.260-1.269.
- Majerus PW, Broze Jr GJ, Miletich JP, Tollefsen DM. Fármacos anticoagulantes, trombolíticos e antiplaquetários. In: Hardman, JG; Limbird LE. (Ed). *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 1996. cap. 54, p. 991-1.005.
- Holmsen H. Platelet metabolism and activation. *Semin Hematol* 1985;22(3):219-240.
- Hovig T. Blood platelet surface and shape a scanning electron microscopic study. *Scand J Haematol* 1970;7:420-427.
- Mustard JF, Packham MA. Factors influencing platelet function – adhesion, release and aggregation. *Pharmacol Rev* 1970;22: 97-187.
- Bithell TC. Abordagem diagnóstica das desordens do sangramento. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J et al. *Wintrobe: hematologia clínica*. São Paulo: Manole 1998d. v 2, cap. 48, p. 1.427-1.457.
- Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927-929.
- Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963;168:178-195.
- Fox JEB. Platelet activation: new aspects. *Haemostasis* 1996; (26) suppl. 4:102-131.
- Lourenço DM. Avaliação Laboratorial da Hemostasia. In: Zago, MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2001. cap. 66, p. 749-755.
- Miller JL. Plaquetas In: Henry JB. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 19ª ed. São Paulo: Manole 1999. p. 701-747.
- Zucker MB. Platelet aggregation measured by the photometric method. *Methods Enzymol* 1989;(169):117-133.
- Harmening DM, Lemery LD. Introduction to hemostasis. An overview of hemostatic mechanism, platelet structure and function, and extrinsic and intrinsic systems. In: Harmening, DM. *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis*. 3ª ed. Philadelphia: FA Davis, 1997. cap 26, p. 481-508.
- Shuman M. Distúrbios hemorrágicos: Anormalidades da função plaquetária e vascular In: Bennett JC, Plum F. *Cecil: tratado de medicina interna*. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997. v. 1, cap. 152, p.1.080-1.091.
- The Worldwide Anaesthetist and Intensivist. Assessing coagulation: Clinical applications, perioperative and ICU concerns. Disponível em: <http://www.anaesthetist.com/icu/organs/blood/clinic.htm>. Acesso em: 18 mar. 2003.
- Kanayama RH. Agregação plaquetária: procedimento técnico. São Paulo: Hospital Israelita Albert Einstein, 2003. 5 p. (Manual Técnico, ALABO. PR. TE. 008).
- Guerra CCC, Kanayama RH, Guerra LGC, Kuwabara RA. Agregação Plaquetária: estudo laboratorial. *Laes Haes* 1998;9(52):48, 50-53.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Tânia Rúbia Flores da Rocha, responsável pelo laboratório de coagulação do Hospital das Clínicas de São Paulo pelo auxílio durante o trabalho, ao professor Dr. Amauri Antiquera Leite pela oportunidade de realizar o trabalho utilizando os aparelhos necessários e ao Dr. José Maria Silveira de Souza, responsável pelo Laboratório Deltha Análises Clínicas de São Carlos pela disponibilidade em emprestar o aparelho para a realização da agregação plaquetária, que foi fundamental na realização desse trabalho.

Atuaram na avaliação o Prof. Celso C. C. Guerra como Editor Associado e dois revisores externos e publicado após concordância com o Editor

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 30/06/2004

Aceito após modificações: 26/11/2004