

Artigo / Article

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

Comparative study of platelet aggregation by turbidimetric and impedance methods in patients under acetylsalicylic acid antiplatelet therapy

Leonardo Lorenzo da Silva¹Elbio Antonio D'Amico²

Introdução: A hiperagregação (agregação excessiva) das plaquetas pode causar a formação de um trombo e a posterior oclusão dos vasos sanguíneos levando à isquemia. Esse fenômeno é responsável por doenças isquêmicas cardiovasculares, como angina pectoris e aterosclerose, bem como outras formas de isquemia, como o acidente vascular cerebral. Visando diminuir a função das plaquetas para reduzir a formação de trombos, o ácido acetilsalicílico vem sendo utilizado para tratamento antitrombótico, com diversos estudos mostrando sua eficácia. Dessa forma faz-se mister o uso de uma ferramenta laboratorial para o monitoramento da efetividade do tratamento, o que é feito por meio do teste de agregação plaquetária. O objetivo desse estudo foi comparar duas metodologias para esse exame (impedância elétrica e turbidimetria) em relação a trinta pacientes adultos de ambos os sexos em uso do fármaco. **Conclusão:** Os resultados mostraram uma boa correlação entre os métodos, possibilitando o uso concomitante de ambas as técnicas em laboratórios clínicos de rotina.

Descritores: Agregação plaquetária; Aspirina; Nefelometria e turbidimetria; Impedância elétrica; Coagulação sanguínea; Colágeno/farmacologia; Heparina/farmacologia

Introdução

A adesão de plaquetas nas paredes dos vasos sanguíneos e subsequente agregação são eventos cruciais tanto na hemorragia 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. 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. Esse fenômeno é responsável por doenças isquêmicas cardiovasculares como *angina pectoris* e aterosclerose, bem como outras formas de isquemia, como o acidente vascular cerebral.⁽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 melito.⁽²⁾ Diversos estudos mostram que o AAS é um efetivo agente antitrombótico quando utilizado

Hospital das Clínicas, Instituto Central, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

¹Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

²Serviço de Hematologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesse: sem conflito de interesse

Recebido: 11/6/2010

Aceito: 27/8/2010

Correspondência: Leonardo Lorenzo da Silva

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º andar – Laboratório de Coagulação – Cerqueira César

05403-000 – São Paulo (SP), Brasil

Tel.: (55 11) 3061-5544 Ramal 287

E-mail: leonardolorenzo@usp.br

regularmente em doses variando entre 50 e 100 mg por dia. Doses superiores (300-1.200 mg por dia) não mostraram diferença na eficácia quando comparadas a doses menores.^(3,4) 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.⁽³⁾

Com a finalidade de monitorar o efeito da terapia com aspirina, o método laboratorial comumente empregado é a agregação plaquetária por turbidimetria, onde se quantifica a função plaquetária por meio de variações óticas do plasma rico em plaquetas mediante a estimulação por determinados agentes agonistas tais como difosfato de adenosina (ADP), adrenalina, colágeno e ácido araquidônico.⁽⁵⁾ 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.⁽⁶⁾

Vários autores divergem quanto ao uso dessas duas técnicas para medir o efeito da terapia à 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 – a turbidimetria.^(1,7-9) Em vista do exposto, o objetivo desse estudo é comparar o método de agregação plaquetária turbidimétrico com o método em sangue total (impedância) em pacientes sob tratamento regular com ácido acetilsalicílico.

Métodos

Foi coletado sangue de trinta doadores normais saudáveis, adultos, de ambos os sexos, e que não fizeram uso de AAS por pelo menos dez dias, sendo esse o grupo controle do teste. Foi coletado também sangue de trinta pacientes adultos, de ambos os sexos, que fazem uso de AAS regularmente e que não possuem histórico de anemia ou qualquer outra doença hematológica, e as amostras dos dois grupos processadas nas duas metodologias como se segue:

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 ótica 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 ótica é monitorada usando-se o agregômetro Chronolog® modelo 540, com um fotômetro conectado a um registrador.

O PRP foi obtido após centrifugação da amostra de sangue coletado por dez minutos a 1.000 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 deu mediante a adição dos seguintes agentes agregantes em determinadas concentrações, tradicionais na literatura: Ácido araquidônico, 1 µM; Colágeno, 2 µg/mL; ADP, 0,75 µM e 7,5 µM.

Agregação por impedância ou sangue total

Esse método se baseia na promoção da agregação das plaquetas em sangue total citratado, mediante ação dos mesmos agentes agonistas acima descritos, porém em diferentes concentrações, de acordo com a literatura: Ácido araquidônico: 0,5 µM; Colágeno: 1,25 µg/mL; ADP: 5 µM e 10 µM.

Em uma cubeta de reação, própria do aparelho, o sangue total é diluído 1:1 com solução salina, totalizando 1 mL de sangue diluído, 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, seguido 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.

Interpretação dos resultados

Há uma divergência de opiniões quanto à 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 aos 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). Assim, a

curva será caracterizada como hipoagregante, hiperagregante e normoagregante. Neste trabalho foram empregadas as duas formas de interpretação da agregação plaquetária turbidimétrica, tanto a numérica quanto a descritiva para nossa avaliação dos resultados.⁽¹⁰⁾

Resultados

Na tabela 1 estão descritos os resultados da agregação plaquetária pelo método de impedância na população controle normal, onde o limite inferior corresponde à média - 2 desvios padrões (s) e o limite superior corresponde à média + 2s.^(11,12)

Tabela 1. Resultados obtidos com os resultados de amplitude máxima em impedância elétrica no grupo controle (n=30)

	ADP 10,0 µM	ADP 5,0 µM	AA 0,5 µM	COL 1,25 µg/mL
Média(Ω)	11,1	5,3	12,4	17,4
Desvio padrão (SD) (Ω)	3,0	3,2	3,0	2,0
2 SD (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

ADP = Difosfato de adenosina; AA: ácido araquidônico; COL = colágeno

Tabela 2. Resultados de agregação plaquetária em turbidimetria, no grupo controle (n=30)

	ADP 7,5 µM (%)	ADP 0,75 µM (%)	AA 1mM (%)	COL 2 µg/mL (%)
Média	65,2	55,5	74,7	63,5
Desvio padrão (SD)	4,6	4,7	4,9	4,7
2 SD	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

ADP Difosfato de adenosina; AA: ácido araquidônico; Col = colágeno

Tabela 3. Número de pacientes com hipoagregabilidade e normoagregabilidade plaquetária de acordo com interpretação da curva de agregação plaquetária nas duas metodologias (n=30)

	Plasma rico em plaquetas				Sangue total			
	ADP 0,75 µM	ADP 7,5 µM	AA mM	COL 2 µg/mL	ADP 5 µM	ADP 10 µM	AA mM	COL 1,25 µg/mL
Número de pacientes hipoagregantes	23	11	26	17	3	9	27	26
Número de pacientes normoagregantes	7	19	4	13	27	21	3	4

ADP: difosfato de adenosina. AA: ácido araquidônico. COL: colágeno

Tabela 4. Porcentagem de pacientes com hipoagregabilidade plaquetária e normoagregabilidade de acordo com interpretação da curva de agregação plaquetária nas duas metodologias (n=30)

	Sangue total				Plasma rico em plaquetas			
	ADP 5 µM	ADP 10 µM	AA 0,5 mM	COL 1,25 µg/mL	ADP 0,75 µM	ADP 7,5 µM	AA 1 mM	COL 2 µg/mL
Hipoagregantes (%)	10	30	90	87	77	37	87	57
Normoagregantes (%)	90	70	10	13	23	63	13	43

ADP: difosfato de adenosina. AA: ácido araquidônico. COL: colágeno

Na tabela 2 estão os resultados da agregação plaquetária pelo método turbidimétrico na população normal com os diferentes agentes agonistas empregados.

Os resultados descritos nas tabelas 1 e 2 definem os valores normais para a população controle com os intervalos sendo definidos entre os limites inferiores e superiores.

O número total de pacientes com baixa agregação e normais foi calculado a partir da amplitude máxima na curva do gráfico da agregação plaquetária (Tabelas 3 e 4).

Com o agente agregante ADP em dose baixa (0,75 µM no método turbidimétrico, e 5 µM no método de impedância elétrica), demonstra-se diferença estatisticamente significativa na proporção de pacientes hipoagregantes (3 pacientes na técnica de impedância e 23 na técnica turbidimétrica) entre os dois métodos (p<0,05). Com o agente agregante, ADP, em dose alta (7,5 µM no método turbidimétrico e 10 µM no método de impedância), não há diferença estatisticamente significativa na proporção de pacientes hipoagregantes (9 pacientes na técnica por impedância e 11 na técnica turbidimétrica) entre os métodos (p>0,05). Com o agente agregante ácido araquidônico, não há também diferenças estatisticamente significativa na proporção de pacientes hipoagregantes (27 pacientes na técnica por impedância e 26 na técnica por turbidimetria) entre os métodos (p>0,05). Com o agente agregante colágeno, nas concentrações clássicas de maior sensibilidade para detectar a inibição da cicloxigenase pelo ácido acetilsalicílico,⁽¹³⁾ observa-se uma maior proporção de pacientes hipoagregantes na técnica por impedância do que na turbidimétrica (26 pacientes na técnica por impedância e 17 pela técnica de turbidimetria), mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre os métodos (p<0,05). Tabela 3.

De acordo com a tabela 4 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 1,25 µg/dL e 90% com ácido araquidônico. Na técnica turbidimétrica (PRP), analogamente, observam-se 77% com ADP 0,75 µM, 37% com ADP 7,5 µM, 57% com colágeno 2 µg/mL e 87% com ácido araquidônico.

Discussão

Com o uso crescente da terapia à 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 testada e comparada 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 obtivemos maior divergência entre as metodologias, onde a técnica turbidimétrica mostrou um número de hipoagregantes (77%) significativamente maior que a técnica 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 1'Ω (Figura 1).

Com o agente agregante ADP em dose alta obtivemos uma boa semelhança entre as duas técnicas, não se obser-

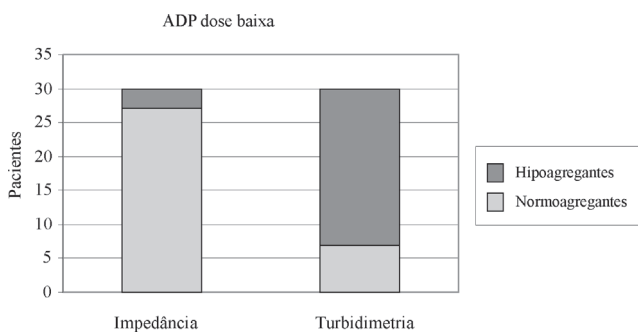


Figura 1. Proporção de pacientes sob uso de AAS considerados hipoagregantes e normoagregantes em relação ao agente agregante ADP em dose baixa (ADP 5 µM – sangue total e ADP 0,75 µM – PRP) nas duas metodologias

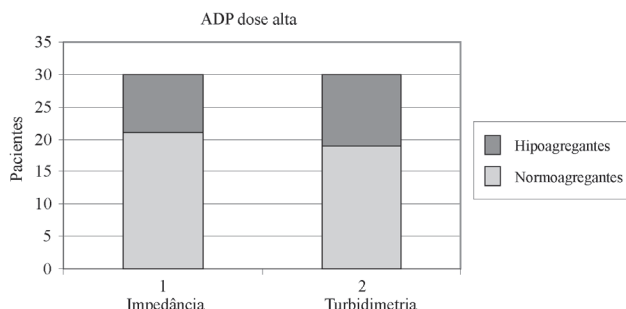


Figura 2. Proporção de hipoagregantes e normoagregantes em relação ao agente estimulante ADP em dose alta (ADP 10 µM em sangue total e ADP 7,5 µM em PRP) nas duas metodologias

vando 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 (Figura 2).

Com o agente agregante ácido araquidônico também não observamos diferenças significativas entre os resultados, mostrando que as duas metodologias se mostraram adequadas para se monitorar o efeito antiplaquetário do AAS. Ambas as 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 técnica por impedância, um total de 90%.

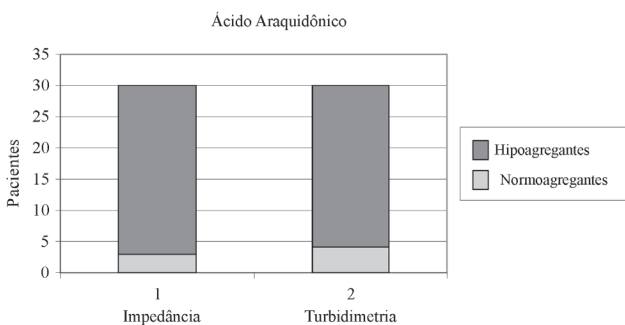


Figura 3. Proporção de hipoagregantes e normoagregantes em relação ao agente ácido araquidônico nas duas metodologias

Estes resultados podem colocar o agente agregante como uma importante ferramenta no controle terapêutico do fármaco, dado que, com a inibição de ciclooxigenase (COX) pela aspirina, não há a conversão do ácido araquidônico em tromboxano A2 (TXA₂) (Figura 3).

Com o agente agregante colágeno, nas doses clássicas utilizadas para a monitorização do fármaco,⁽¹³⁾ 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 alguns autores, que também demonstrou a sensibilidade maior do método por impedância para esse agregante (Figura 4).⁽¹⁰⁾

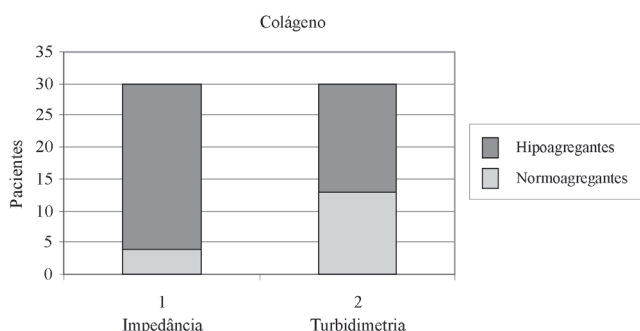


Figura 4. Proporção de pacientes hipoagregantes e normoagregantes em relação ao agente agregante colágeno nas duas metodologias

Como alguns autores, 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 antiplaquetário 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.⁽⁷⁾

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 subnutridos, crianças e recém-nascidos, cuja dificuldade de coleta é maior.

Pode também resolver outros importantes interferentes da agregação plaquetária por turbidimetria, como amostras hemolisadas, ictericas 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 à 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 sanguínea, 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 rapidamente, sendo interessante tanto para o clínico, que terá resultados mais rápidos, quanto para o laboratório, que não precisa dispor de um funcionário por mais tempo para realizar um exame.

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 à base de ácido acetilsalicílico.

Abstract

Introduction: Hyperaggregation of platelets can cause the formation of thrombi and subsequent occlusion of blood vessels leading to ischemia. This phenomenon can be responsible for ischemic cardiovascular diseases such as angina pectoris and atherosclerosis as well as other forms of ischemia such as stroke. To decrease platelet function and reduce the formation of thrombi, acetylsalicylic acid has been used for antithrombotic treatment, with several studies showing its effectiveness. Therefore it is necessary to use a laboratory tool to monitor the effectiveness of treatment, which is achieved through laboratory testing of platelet aggregation. The aim of this study was to compare two different methods (impedance and turbidimetry) to test platelet aggregation in 30 adult patients of both genders taking acetylsalicylic acid. Conclusion: The results show that there is a good correlation between these two methods and so both these techniques can be used in the clinical routine.

Keywords: Platelet aggregation; Aspirin; Nephelometry and turbidimetry; Electric impedance; Blood coagulation; Collagen/pharmacology; Heparin/pharmacology

Referências

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. *Br J Pharmacol.* 2001;133(8):1396-404.
2. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial

- infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet*. 1988;2(8607):349-60. Comment in: *Lancet*. 1997;349(9064):1551.
3. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G; American College of Chest Physicians. Roth. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th edition). *Chest*. 2008;133(6 Suppl):199S-233S.
 4. Farrell B, Godwin J, Richards S, Warlow C. The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991;54(12):1044-54. Margaret LR, Roland L, Marian AP. Platelet function assays. *Transfus Apheresis Sci*. 2003;28:307-17.
 5. Serebruany V, McKenzie M, Meister A, Fuzaylov S, Gurbel P, Atar D, et al. Whole blood impedance aggregometry for the assessment of platelet function in patients with congestive heart failure (EPCOT Trial). *Eur J Heart Fail*. 2002;4(4):461-7.
 6. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Sanak M, Nizankowski R. Aspirin resistance. *Pharmacol Rep*. 2005;57 Suppl:33-41.
 7. Hillarp A, Lethagen S, Mattiasson I. Aspirin resistance is not a common biochemical phenotype explained by unblocked cyclooxygenase-1 activity. *J Thromb Haemost*. 2003;1(1):196-7.
 8. Hart RG, Leonard AD, Talbert RL, Pearce LA, Cornell E, Bovill E, et al. Aspirin dosage and thromboxane synthesis in patients with vascular disease. *Pharmacotherapy*. 2003;23(5):579-84.
 9. Riess H, Braun G, Brehm G, Hiller E. Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. *Am J Clin Pathol*. 1986; 85 (1):50-6.
 11. Botter DA, Paula GA, Leite JG, Cordani LK. Noções de estatística. São Paulo: Instituto de Matemática e Estatística/Universidade de São Paulo; 1996
 12. Clinical and Laboratory Standard Institute. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline [Internet]. 3th ed. Pennsylvania; CLSI; 2008.[cited 2009 Dec 12]. Available from: <http://www.clsi.org/source/orders/free/c28-a3.pdf>
 13. Mackie IJ, Jones R, Machin SJ. Platelet impedance aggregation in whole blood and its inhibition by antiplatelet drugs. *J Clin Pathol*. 1984;37(8):874-8.
 14. Eikelboom J, Feldman M, Mehta SR, Michelson AD, Oates JA, Topol E. Aspirin resistance and its implications in clinical practice. *Med Gen Med*. 2005;7(3):76.