

ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
HEMATOLOGIA AVANÇADA

MATEUS INGUI LOPES

**USO LABORATORIAL DO TESTE DE
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

Artigo Científico de Conclusão de Curso
apresentado à Academia de Ciência e
Tecnologia, como parte das exigências para
obtenção do Título de Especialização em
Hematologia Avançada.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2012

• INTRODUÇÃO

A plaqueta exerce um importante papel na fase inicial da hemostasia através de seu mecanismo de adesão plaquetária a superfícies estranhas, agregação entre si formando o tampão plaquetário e ativação da coagulação plasmática pela exposição do fator III (tecidual) e liberação do fator IV (Ca^{2+}).

Normalmente as plaquetas aderem ao colágeno do subendotélio, agregam entre si e secretam seus conteúdos granulares, isto depende de fatores como: membrana das plaquetas normais, nível de fibrinogênio plasmático normal e secreção normal das organelas plaquetárias.

O estudo da agregação plaquetária é utilizado na avaliação da função das plaquetas por diferentes vias de ativação plaquetária *in vitro*. É um teste útil nas investigações de algumas patologias como doença de Von Willebrand, Bernard Soulier, tromboastenia de Glanzmann entre outras.

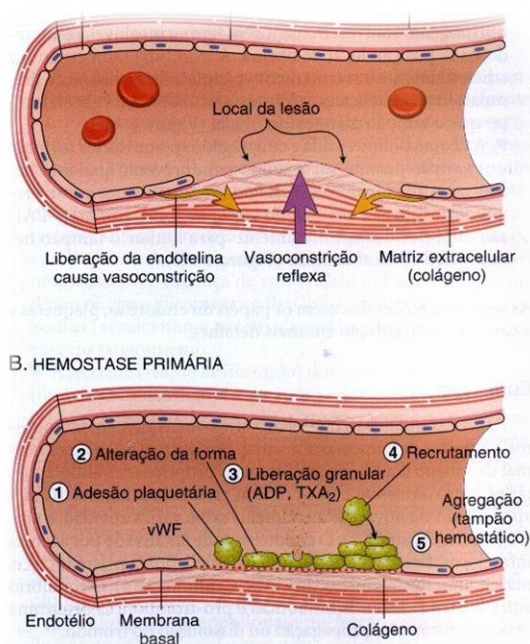
Os dois mecanismos principais que estão envolvidos são:

ADESÃO PLAQUETÁRIA

As plaquetas aderem às superfícies estranhas através da ligação das glicoproteínas de sua membrana, sendo esta uma proteína plasmática indispensável chamada de fator de Von Willebrand.

Laboratorialmente esta fase de adesão plaquetária pode ser estudada por testes como tempo de sangramento, teste adesividade plaquetária, agregação plaquetária (com ristocetina) e dosagem do fator VIII da coagulação.

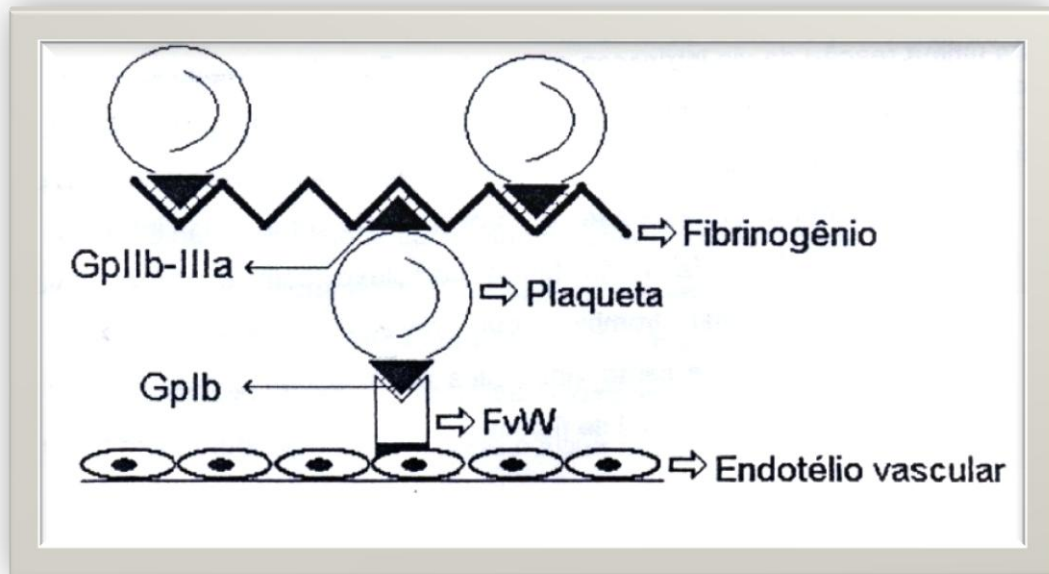
As principais patologias relacionadas a defeitos nessa fase da coagulação são: Doença de Von Willebrand, Trombastenia de Glanzmann e Síndrome de Bernard Soulier.



AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

As plaquetas quando estimuladas, aderem-se umas as outras formando uma massa ou agregado plaquetário, ainda reversível, que numa fase mais avançada, com a perda da morfologia individual de cada plaqueta e liberação de seus conteúdos granulares, forma um trombo irreversível. Quando estimuladas tornam-se discóides alterando sua morfologia, emitindo pseudópodes e entrelaçando-se entre si com o fibrinogênio ligado as glicoproteínas da membrana plaquetária.

Para tudo isso acontecer a plaqueta é dependente de uma proteína chamada tromboastenia, que esta, por sua vez depende de cálcio (Ca^{2+}).



Após a ativação das plaquetas, ocorre um processo de formação e ativação de várias substâncias tais como: Tromboxano, fosfolípeos e ADP (este último pode ser inibido pelo AAS). Além disso, ocorre a exposição de receptores de fibrinogênio (GPIIb – IIIa), que irão formar pontes entre as novas plaquetas, como mostra a figura acima.

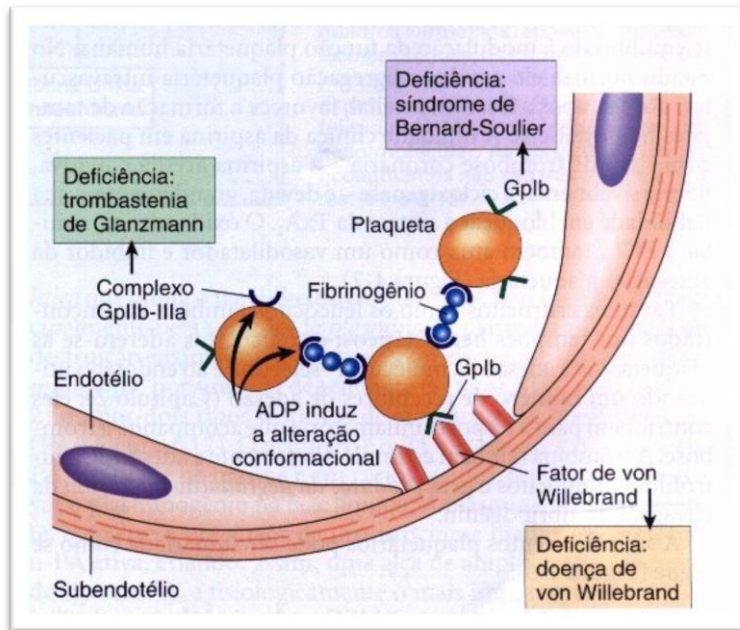
A mobilização do cálcio é inibida pelo AMP cíclico que é formado ao nível das membranas plaquetária, a partir de ATP.

Este conjunto (Ca^{2+} e AMP cíclico) é chamado sistema modulador da agregação plaquetária.

A membrana plaquetária possui receptores alfa adrenérgicos e receptores para ADP, a adrenalina em contato com esses receptores reduz a concentração de AMP cíclico pela inibição da adenilciclase, assim permitindo a agregação plaquetária.

Existem ainda duas vias descritas de agregação plaquetária: A via dependente da síntese de tromboxano ou do ácido aracônico e a via de fator agregante das plaquetas.

Na primeira, o ácido aracônico liberado dos fosfolípeos da membrana pela fosfolipase A2, transforma-se em endoperoxidos pela ação da cicloxigenase. Os endoperoxidos dão origem ao tromboxano, que é o mais potente agente agregante e vasoconstritor e que também pode ser inibido pelo AAS.



• COLETA

A coleta de sangue do paciente deve ser feita isenta de qualquer medicação que possa interferir na agregação plaquetária. Para a aspirina, por exemplo, são necessários 7 dias. Nas mulheres, o ideal é que o estudo seja realizado na última semana do ciclo menstrual.

Deve ser feita com pouco tempo de garroteamento e com punção venosa limpa, que permita fluxo rápido para a seringa, sem necessidade de aspiração intensa. O material utilizado deve ser plástico ou siliconizado. Os tubos de vidro aderem e ativam as plaquetas.

O anticoagulante é o citrato de sódio a 3,2%, a proporção de anticoagulante para sangue deve ser de 9:1 como nos testes de coagulação em geral. Suas proporções e concentrações devem ser rigidamente controladas, pois o excesso de anticoagulante quebra o cálcio intraplaquetário, bloqueando assim sua agregação.

O tubo após a coleta deve ser homogeneizado por inversão lenta, e mantido a temperatura ambiente, pois a refrigeração reduz a atividade plaquetária. Os testes devem ser realizados em tempo fixo após a coleta, para todos os casos nunca deve se ultrapassar 4 horas.

• PREPARACAO DO PRP e PPP

O plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido a partir da centrifugação lenta do tubo de citrato à 1.000 rpm por 3 a 5 min, realizado após a coleta. A centrifugação deve ser feita padronizada em cada laboratório para que se obtenha um plasma rico em plaquetas (PRP) em níveis de 150.000 a 250.000 plaquetas por mm^3 .

Após a retirada do plasma rico para outro tubo plástico se obtém o plasma pobre em plaquetas (PPP), pela centrifugação do mesmo tubo de citrato por cerca de 3.000 rpm por 10 min. Todas estas etapas que são descritas acima, devem ser feitas em tubos vedados para evitar perda de CO_2 , que eleva o pH interferindo nas curvas da agregação.

O PRP deve ser deixado em repouso por cerca de 30 a 60 minutos à temperatura ambiente antes do início dos testes.

A concentração plaquetária do PRP deve ser controlada pela diluição, se necessária com o PPP do mesmo paciente, afim de que sua concentração de PRP não seja, nem baixa demais (curvas com falsa idéia de hipofunção), nem altas demais (curvas hiperagregantes).

• AGENTES AGREGANTES

- Adrenalina

O cloreto de adrenalina P.M. 183,2 é o mais comumente utilizado para testes de agregação plaquetária. As soluções em ampolas para uso clínico são adequadas. Depois de serem abertas, as ampolas devem ser alíquotadas e congeladas.

O uso de rotina no laboratório para o teste de agregação plaquetária é na proporção de 20 microlitros de adrenalina para 400 microlitros de PRP.

Variações podem ocorrer em função da procedência da adrenalina e de sua diluição, por isso recomenda-se que se adquira um grande número de ampolas de mesmo lote para que os resultados sejam reprodutivos.

Os outros agentes agregantes que são utilizados como avaliação da produção de tromboxana A₂ são: ADP, Colágeno e Ácido Araquidônico.

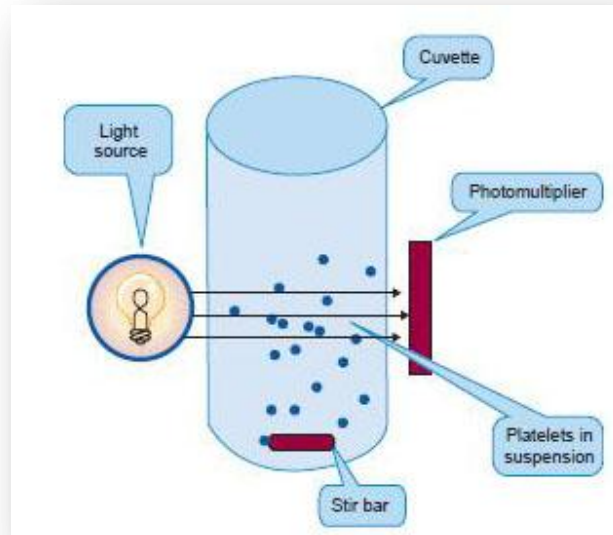
Outro agente agregante que é utilizado para o teste, mas que difere dos demais pela avaliação da proteína de membrana Gp Ib (Fator de Von Willebrand) é a Ristocetina.

• PRINCIPIOS DO TESTE

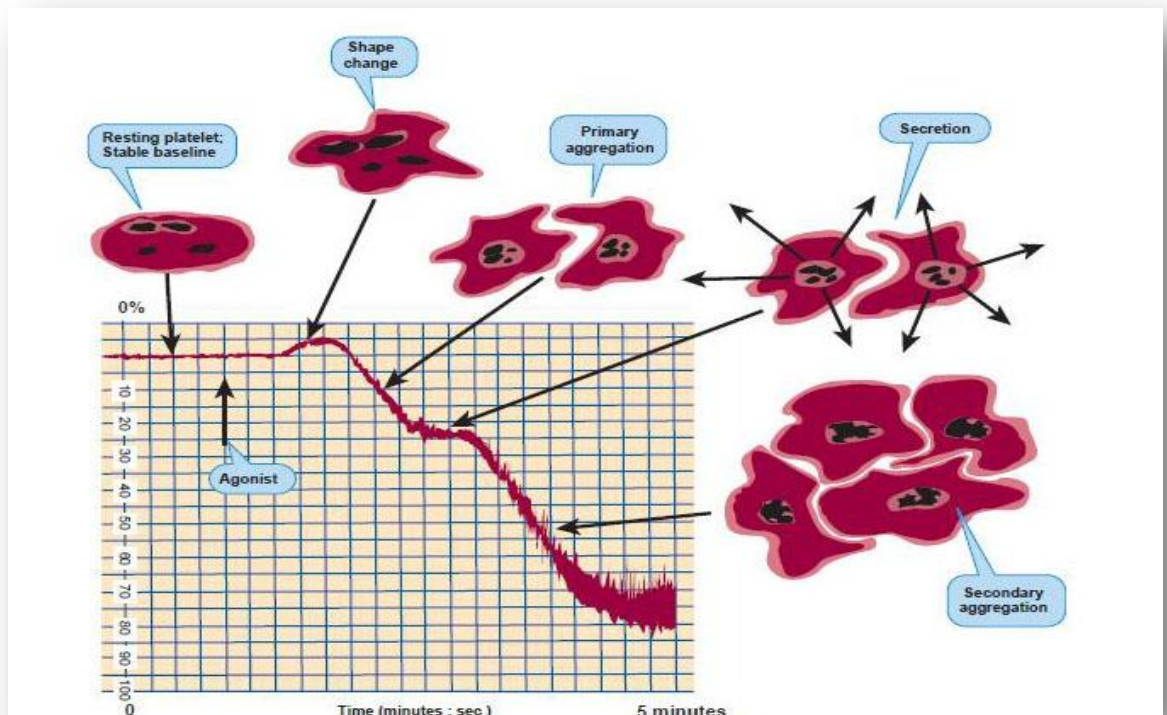
A agregação plaquetária pode ser medida em qualquer sistema fotométrico através da alteração da transmitância de um plasma rico em plaquetas, ao qual se adiciona o agente agregante. As plaquetas em suspensão deixam esse plasma turvo, diminuindo a passagem de luz. Quando agregam formam grandes grumos, deixam a luz passar, aumentando a transmitância.

O método de Born permite registrar esse fenômeno de forma cinética, pelos agregômetros.

Os agregômetros possuem um cubeta que estabiliza-se a 37 °C, acoplada a um agitador magnético que mantém as plaquetas em suspensão homogênea.



A figura acima detalha o método de Born de um agregômetro.



A fonte de luz e a medição de luz transmitida são adequadas a turbidimetria, e a leitura registrada é feita em um gráfico que proporciona o registro cinético de toda a agregação.

• PROCEDIMENTO DO TESTE

O procedimento do teste começa com o aparelho ligado e estabilizado à temperatura de 37 °C. Coloca-se o PRP nas cubetas e um imã em cada uma delas. O aparelho é calibrado e zerado com o PPP do paciente a ser testado. Calibrar a transmitância máxima com o PPP do paciente, aguardar 1 minuto para a estabilização tanto da temperatura quanto da calibração.

Logo após adiciona-se o agente agregante e registra-se a curva por 5min em um gráfico cinético.

A cada novo teste é repetida a manobra de calibração, sendo sempre realizado em paralelo um teste normal para validação. Os pequenos imãs devem ser lavados após cada uso em água corrente.

Após a realização do teste, o gráfico é analisado em alguns aspectos como:

- Resposta inicial
- Intensidade da primeira onda
- Intensidade da segunda onda
- Porcentagem de agregação no quinto minuto
- Velocidade angular
- Morfologia da curva

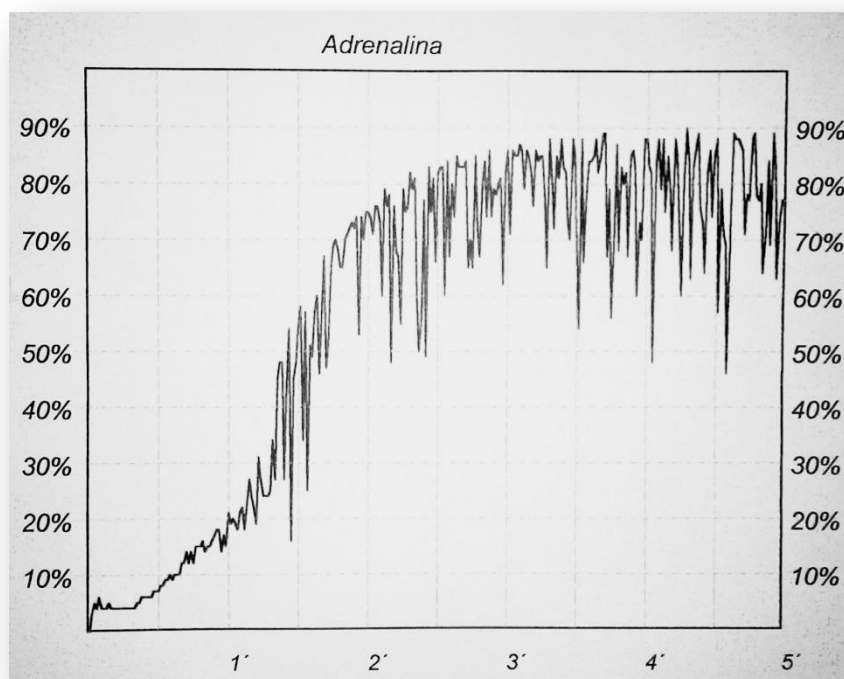


Figura acima representando um gráfico de curva de agregação plaquetária utilizada como controle normal utilizando adrenalina como agente agregante.

• ALTERACOES NA CURVA DE AGREGAÇÃO

Diminuição da Agregação: Doença de Von Willebrand, Glanzmann ou Síndrome de Bernard-Soulier.

Aumento da Agregação: Hipercoagulabilidade ou trombose venosa profunda.

• CONCLUSÃO

A curva de agregação plaquetária mostra ser, um método laboratorial eficiente como auxiliar para o controle das coagulopatias e funcionalidade das plaquetas. A curva de agregação plaquetária é um método de controle e auxílio no uso também de agentes antiagregantes com a Aspirina (AAS), Ticlopidina, Clopidogrel e a Dipyridamol.

O uso do teste de agregação plaquetária, dentro da rotina de um laboratório traz um custo benefício alto em relação aos pacientes, pois a cada dia cresce o número de pacientes que fazem uso contínuo de agentes antiagregantes e como citado acima os mesmos poderão fazer controles de uso de seus medicamentos rotineiramente, sendo assim um teste importante na rotina laboratorial de hematologia e hemostasia.

- **BIBLIOGRAFIA**

- Guerra, Dr. Celso C. de Campos., Centro de Hematologia de São Paulo. Agregação Plaquetária Estudo Laboratorial.
- Qualiterm – Manual do usuário – Agregômetro.
- Rodak, Berbadette F; Fritisma, George A., Hematology – Clinical Principles and Applications, 3^a ed., Saunders., Philadelphia, 2007.
- Janeway Jr, C.A. & Travers, P., Imunobiologia, Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.