



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Estudo da Antiagregação Plaquetar através da Técnica PFA-100 em Pacientes com Doença Cardiovascular

Jéssica Xastre Perpétuo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Doutor Vítor Branco

Covilhã, Abril de 2013

Dedicatória

*Aos meus pais e à minha irmã, pelo amor incondicional,
pelo apoio e coragem que sempre me transmitiram.*

Sem eles não seria possível!

Agradecimentos

Ao Doutor Vítor Branco, o meu orientador, pela disponibilidade, ajuda e serenidade em todas as fases da concretização desta dissertação.

À Doutora Rosa Saraiva por me ter disponibilizado todos os artigos científicos que eu necessitava e pelo apoio concedido.

Aos meus pais pela presença assídua em todas as fases da minha vida, pelo carinho e dedicação.

À minha irmã, pela compreensão e ajuda.

Aos meus amigos, em especial à Helena, à Inês Ferreira e à Inês Nabais, amigas e confidentes de todos os momentos. Recordo com saudades todos os momentos que passamos juntas ao longo destes seis anos!

Às minhas colegas de casa, Inês e Rute, pelo apoio nos momentos mais difíceis da realização desta tese.

À Lara, a minha pequena sobrinha, que mesmo sem saber, me deu tanta força e coragem para finalizar este trabalho.

A mim!

Resumo

As doenças cardiovasculares representam uma importante causa de mortalidade e morbidade precoce no mundo inteiro. O papel da antiagregação plaquetar tem tido uma importância clínica crescente no tratamento destes pacientes e a sua actividade e o seu uso tem sido alvo de várias pesquisas. O efeito farmacológico das classes de antiagregantes plaquetares caracteriza-se por, mediante o seu mecanismo de acção, produzirem um efeito na fisiologia da hemostase primária, com consequências clínicas que são conhecidas, mas a correlação do efeito laboratorial com o efeito terapêutico ainda é objecto de investigação. O estudo da agregação plaquetar, inserido no estudo mais global da hemostase primária, é hoje efectuado através de diversos métodos laboratoriais, alguns dos quais introduzidos na prática clínica corrente.

O objectivo do presente trabalho é descrever os principais métodos laboratoriais aplicados na avaliação da actividade dos antiagregantes plaquetares, com principal atenção sobre a técnica Platelet Function Analyser (PFA-100) e investigar a sua potencial correlação com a clínica e terapêutica.

Seguiu-se com a metodologia de revisão sistemática de literatura. São descritos os métodos de Agregometria, Tromboelastometria, VerifyNow Assay® (Rapid Platelet Function Analyser - RPFA) e Platelet Function Analyser® (PFA-100) [Siemens]. Discutiu-se os resultados obtidos por testes PFA-100 de amostras sob o efeito de diversos antiagregantes plaquetares e discutiu-se a sua potencial utilização em situações clínicas.

Conclui-se que a técnica PFA-100 é útil na monitorização do tratamento com os inibidores da glicoproteína IIb/IIIa, mostrando diferenças na fase de recuperação dos diferentes agentes. Relativamente aos inibidores P2Y₁₂, vários estudos evidenciaram o uso limitado da técnica PFA-100 na sua monitorização. Em contraste, alguns estudos mostraram a utilidade do teste para estudo de um subconjunto de pacientes com AVC, tratados com clopidogrel e para prever resultados adversos em doentes, após intervenção percutânea nos membros inferiores. Verificou-se um sinergismo nos efeitos antiagregantes plaquetares do ácido acetilsalicílico e do clopidogrel, quando usados em conjunto. O teste tem sido, igualmente, amplamente usado para detectar resistências ao ácido acetilsalicílico e correlacionar este facto com futuros eventos adversos nos doentes. Assim, a técnica PFA-100 torna-se um método promissor no estudo da antiagregação plaquetar mas ainda são necessários mais estudos para permitir concluir a sua utilidade em situações clínicas.

Palavras-chave

Inibidores da agregação plaquetar, Testes de função plaquetar, Trombose coronária, Doenças cerebrovasculares, Enfarte cerebral.

Abstract

Cardiovascular diseases are a major cause of premature mortality and morbidity worldwide. Antiplatelet therapy has a growing role in the treatment of these patients and their activity and their use have been the subject of several studies. Different classes of platelet inhibitors are characterized by their mechanism of action, produce an effect on the physiology of primary hemostasis, with known clinical results. The correlation between laboratory effect and therapeutic result is still subject to research. The study of platelet aggregation, inserted in the study of global primary hemostasis, can be done by various laboratory methods, some of which are introduced in current clinical practice.

The purpose of this paper is to describe the laboratory methods more frequently used in the assessment of antiplatelet activity, a focus on Platelet Function Analyzer technique (PFA-100) and to investigate its potential therapeutic correlation.

The methodology followed was a systematic review of literature. The methods described are Aggregometry, Thromboelastography, VerifyNow Assay® (Rapid Platelet Function Analyzer - RPFA) and Platelet Function Analyzer® (PFA-100) [Siemens]. Studies of PFA-100 in different clinical settings are reviewed.

It was concluded that the technique PFA-100 is useful in monitoring the treatment with the inhibitors of glycoprotein IIb / IIIa, showing differences in the recovery phase of the different drugs. For the P2Y₁₂ inhibitors, several studies have found little effect on PFA-100 monitoring. Some studies have shown that the PFA-100 is useful to study a subset of stroke patients treated with clopidogrel and for predicting adverse outcomes in patients following percutaneous interventions of the lower limbs. There was a synergism in the effects of antiplatelet with acetylsalicylic acid and clopidogrel, when used together. The test has been also used to detect resistance to acetylsalicylic acid and correlating this with future clinical events in patients. Thus, the technique PFA-100 becomes a promising method to study antiplatelet therapy but more studies are needed to conclude their usefulness in clinical situations.

Keywords

Platelet aggregation inhibitors, Platelet function tests, Coronary thrombosis, Cerebrovascular diseases, Cerebral infarction.

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	x
Índice	xii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Gráficos	xvi
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Acrónimos e Abreviaturas.....	xx
1. Introdução	1
1.1 Objectivos.....	2
2. Metodologia.....	3
3. Papel das plaquetas na hemostase primária e na aterotrombose	4
4. Visão global da terapia antiagregante plaquetar	7
5. Métodos de estudo laboratoriais da hemostase primária	13
5.1 Agregometria	13
5.2 Tromboelastografia - TEG.....	15
5.3 VerifyNow Assay® (Rapid platelet function analyser - RPFA)	16
5.4 Platelet Function Analyser® - PFA-100.....	18
5.4.1 Descrição da técnica.....	18
5.4.2 Variáveis externas	20
5.4.3 Uso clínico.....	23
6. Conclusão	30
7. Bibliografia	32

Lista de Figuras

Figura 1:Activação das plaquetas nos locais de lesão vascular	5
Figura 2:Mecanismo de acção dos antiagregantes plaquetares	7
Figura 3:Agregómetro de 4 canais baseado na medição turbidométrica da agregação plaquetar em amostras de plasma rico em plaquetas	13
Figura 4:Traçado agregométrico em plasma rico em plaquetas activado por colagénio como agente agonista	14
Figura 5:VerifyNow Assay®	16
Figura 6:PFA-100 - Analisador da função plaquetar	18
Figura 7:Princípio do método PFA-100	19
Figura 8:Relação entre o factor von Willebrand e o tempo de fecho nos cartuchos de Col-ADP e Col-EPI	22
Figura 9:Tempo de fecho no cartucho Col-EPI com a técnica PFA-100 com o tratamento com aspirina, clopidogrel e ambos.	24
Figura 10:Tempo de fecho no cartucho Col-ADP com a técnica PFA-100 com o tratamento com aspirina, clopidogrel e ambos.	24
Figura 11:Média do prolongamento dos testes de cada indivíduo (tempo de sangramento e de oclusão) em cada ponto de tempo medido.	27

Lista de Gráficos

Gráfico 1:Diferenças entre as duas doses de aspirina e as duas preparações de aspirina usadas, no tempo de fecho.....	26
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1:Agentes antiagregantes plaquetares orais aprovados pela FDA	10
Tabela 2:Mecanismos responsáveis pela variabilidade de resposta plaquetar do clopidogrel .	11
Tabela 3:Agentes antiagregantes plaquetares em investigação	12
Tabela 4:Relação entre o tempo de fecho nos dois cartuchos e o citrato de sódio usado como anticoagulante	21
Tabela 5:Tempo de fecho medido durante a terapia com os inibidores da GP IIb/IIIa	23
Tabela 6:Relação entre a recorrência de doença e a resposta à terapia antiagregante plaquetar	25
Tabela 7:Relação entre os factores clínicos e laboratoriais e os resultados da técnica PFA-100 dos grupos de pacientes que receberam 100 mg/dia e 300 mg/dia de aspirina.....	26
Tabela 8:Eventos clínicos adversos de acordo com o grau de resposta à aspirina	28

Lista de Acrónimos e Abreviaturas

PFA-100	Platelet Function Analyser-100
AI	Angina instável
IAMSEST	Enfarte do miocárdio sem supradesnivelamento de ST
IAMEST	Enfarte do miocárdio com supradesnivelamento de ST
AVC	Acidente vascular cerebral
AIT	Acidente transitório isquémico
NO	Óxido nítrico
vWF	Factor Von Willebrand
GP	Glicoproteína
MEC	Matriz extracelular
Fg	Fibrinogénio
ADP	Adenosina difosfato
TXA ₂	Tromboxano A ₂
COX-1	Ciclooxigenase 1
PAR	Protease-activated receptor
ASA,AAS	Aspirina, Ácido Acetilsalicílico
SCA	Síndrome coronário agudo
TAS	Ticlopidine Aspirin Stroke Study
EUA	Estados Unidos da América
FDA	US Food and Drug Administration
RPFA	Rapid platelet function analyser
TEG	Tromboelastografia
PART	Peptídeo activador do receptor de trombina
Col-ADP	Colagénio - Adenosina difosfato
Col-EPI	Colagénio - Adrenalina
CT	Tempo de fecho

1. Introdução

As doenças cardiovasculares representam uma importante causa de mortalidade e morbidade precoce no mundo industrial, tendo vindo a tornar-se um problema crescente em diversos países em vias de desenvolvimento. As plaquetas desempenham um papel importante na formação do trombo arterial, sendo responsáveis pelas manifestações agudas da aterosclerose (síndromes coronárias agudas, doença arterial periférica e doença cerebrovascular) e pelas complicações trombóticas em endopróteses coronárias (stents) [1,2,3,4]. Assim, a antiagregação plaquetar tem tido uma importância clínica crescente nestas doenças, tornando-se a pedra angular do tratamento. Vários ensaios clínicos mostraram que a combinação do ácido acetilsalicílico com um antagonista do receptor P2Y₁₂ (por exemplo, o clopidogrel) traz benefícios clínicos nestes pacientes, principalmente em doentes coronários [5, 6, 7].

Vários estudos laboratoriais têm relatado uma resposta plaquetar altamente variável em pacientes tratados tanto com o clopidogrel como com a aspirina [8]. Nos últimos anos, o conceito de resistência à aspirina tem sido amplamente enfatizado na literatura médica embora a sua definição ainda seja incerta [8]. Menos conhecido do que a resistência à aspirina, mas certamente melhor caracterizada, é a questão da “resistência ao clopidogrel”, que é, provavelmente causada por alterações no metabolismo, que reduzem a formação do metabolito activo do clopidogrel [8]. Tem sido mostrado que os pacientes que não evidenciam uma inibição suficiente das plaquetas durante a terapia estão em maior risco de sofrer eventos vasculares adversos, no futuro [8].

Assim, para além do estudo dos resultados terapêuticos destes tratamentos, em ensaios clínicos, é útil o estudo dos efeitos farmacológicos in vitro, em utilização terapêutica real, a fim de assegurar a dosagem óptima e o benefício clínico para os pacientes. O estudo da agregação plaquetar, inserido no estudo mais global da hemostase primária é hoje efectuado através de diversos métodos laboratoriais, alguns dos quais introduzidos na prática clínica corrente. O considerado “padrão ouro” para a avaliação da função plaquetar é a agregometria baseada na medição turbidométrica da agregação plaquetar. Esta técnica mede a transmissão de luz resultante do agregado de plaquetas, após a adição do reagente. Este teste apresenta alguns inconvenientes: é bastante laborioso, requer um controlo de qualidade cuidadoso e um grau elevado de especialização por parte de quem desempenha a técnica e interpreta os resultados. Assim houve interesse em desenvolver novas técnicas laboratoriais [9].

Em 1995, desenvolveu-se um teste simples, rápido e que não requer formação especializada, o analisador da função plaquetar, PFA-100. O teste é bastante útil como ferramenta de

rastreio para investigar possível doença de von Willebrand e outros distúrbios plaquetares, mas também tem sido proposto como sendo adequado para a detecção da resposta aos diversos antiagregantes plaquetares, tais como os inibidores da glicoproteína IIb/IIIa, a aspirina e as tienopiridinas [9].

1.1 Objectivos:

Esta revisão da literatura tem os seguintes objectivos:

- a) Descrever a fisiologia da hemostase primária.
- b) Descrever resumidamente os fármacos modificadores da hemostase.
- c) Descrever os principais métodos de estudo laboratorial da hemostase primária e mais detalhadamente a técnica PFA-100.
- d) Analisar os trabalhos publicados sobre a avaliação laboratorial da agregação plaquetar (hemostase primária) no contexto do tratamento da doença cardiovascular.
- e) Analisar os trabalhos publicados avaliando os efeitos farmacológicos (curvas de dose-efeito, duração dos efeitos, avaliação das resistências) dos diversos antiagregantes plaquetares, utilizando a técnica PFA-100.

2. Metodologia

A metodologia utilizada foi uma pesquisa bibliográfica exaustiva das informações mais actuais existentes na base de dados PubMed ([http:// www. pubmed. com](http://www.pubmed.com)). Foram ainda utilizadas algumas publicações listadas nos artigos obtidos. A pesquisa foi feita com as seguintes palavras-chave: “antiplatelet”, “PFA-100”, combinado com “Aspirin”, “Clopidogrel”, “Aspirin resistance” e “Aspirin variability” e “VerifyNow” combinado com “Aspirin” e “Clopidogrel”.

Aquando da pesquisa, não houve restrição de data nem de idioma.

3. Papel das plaquetas na hemostase primária e na aterotrombose

As plaquetas desempenham um papel crucial na hemostase primária, prevenindo a perda de sangue devido a uma lesão vascular, mas são também responsáveis pela formação de trombos patogénicos, associados às manifestações agudas da aterosclerose, tais como os síndromes coronários agudos (angina instável (AI), enfarte do miocárdio sem supradesnivelamento de ST (IAMSEST), enfarte do miocárdio com supradesnivelamento de ST (IAMEST), acidente vascular cerebral (AVC), acidente transitório isquémico (AIT) e doença arterial periférica) [1, 2, 3, 4]. A aterosclerose desenvolve-se dentro da íntima das artérias de grande e médio calibre e pode ser influenciada pelo comportamento, pelo ambiente, pelos factores bioquímicos e pelos factores genéticos [2]. A característica patológica da aterosclerose é uma disfunção endotelial, que é marcada pela expressão, pelas células endoteliais, de moléculas de adesão celular e pelo aumento da permeabilidade endotelial para lipoproteínas, leucócitos e outros mediadores inflamatórios [2]. A composição das placas e a inflamação localizada contribui decisivamente para a instabilidade da placa e para a sua ruptura/erosão, que expõe o sangue circulante a um ambiente altamente trombogénico e que provoca a activação inadequada das plaquetas, levando à formação de trombos [10]. Os trombos podem levar à oclusão do fluxo de sangue nas artérias e à isquemia e enfarte de órgãos vitais, sendo responsáveis pelas manifestações clínicas da aterosclerose [11].

A activação das plaquetas é fundamental para a hemostase e para a formação de trombos patológicos, pois as plaquetas são o constituinte primário de trombos oclusivos nos sítios de ruptura ou erosão das placas ateroscleróticas [11]. A sua activação é gerada em três etapas: (1) uma fase de iniciação que envolve a adesão das plaquetas, (2) uma fase de extensão que inclui a activação, o recrutamento adicional e a agregação de plaquetas, e (3) uma fase de perpetuação caracterizada pela estimulação de plaquetas e formação de coágulos de estabilização [12].

Sob condições fisiológicas, as plaquetas circulam no sangue num estado de repouso e a sua activação é inibida por factores libertados pelas células endoteliais, incluindo o óxido nítrico (NO) e a prostaglandina I₂ [12]. No entanto a lesão endotelial desencadeia o recrutamento e a adesão de plaquetas. Na fase de iniciação da hemostase primária, a adesão de plaquetas nos locais de lesão vascular é mediada por um processo de múltiplos passos que envolve a interacção de plaquetas com a matriz subendotelial que contém várias macromoléculas adesivas, incluindo o factor de von Willebrand (vWF), que se liga ao receptor GP Ib-V-IX das plaquetas, e o colagénio que interage com o receptor GP VI [1]. Estas interações permitem a activação das plaquetas aderentes.

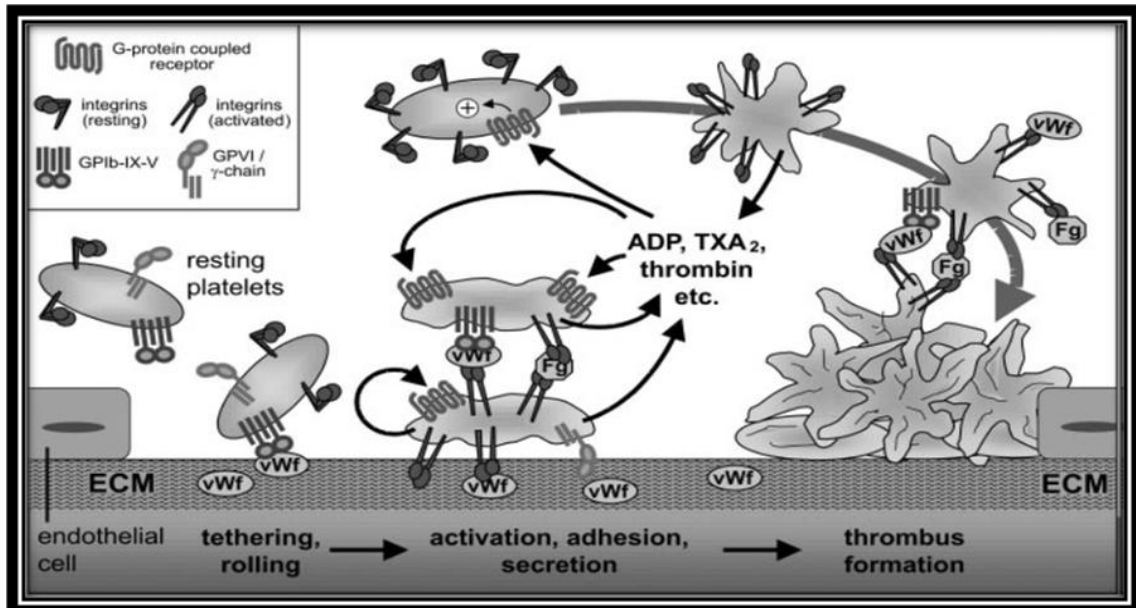


Figura 1: Ativação das plaquetas nos locais de lesão vascular. O contacto inicial das plaquetas com a matriz extracelular subendotelial é mediado pelo factor de von Willebrand com o receptor GPIb-V-IX, seguido da activação do receptor GPVI pelo colagénio. Isto resulta na libertação de ADP, TXA₂ e trombina, que reforça a adesão das plaquetas e a formação e libertação adicional de mediadores, originando, assim, o recrutamento de mais plaquetas, para o crescimento do tampão hemostático. MEC indica matriz extracelular; Fg, Fibrinogénio. Adaptado da referência [1].

Durante a fase seguinte de activação plaquetar, na fase de extensão, plaquetas adicionais são recrutadas e activadas mediante uma variedade de mediadores que são produzidos pelas plaquetas. Estes factores incluem adenosina difosfato (ADP), tromboxano A₂ (TXA₂) e trombina, sendo este o mais potente. A activação das plaquetas pelo ADP é mediada por dois receptores: o P2Y₁ e P2Y₁₂. TXA₂ é produzido a partir do ácido araquidónico, pela ciclooxigenase 1 (COX-1) e é libertado pelas plaquetas aderentes, amplificando a adesão das mesmas pela ligação aos receptores TPα e TPβ [1]. ADP e TXA₂ são responsáveis, para além do recrutamento da circulação de plaquetas, da promoção da alteração da forma das plaquetas e da secreção de grânulos citoplasmáticos [13]. A trombina activa as plaquetas por ligação ao PAR-1 (activado por concentrações muito pequenas de trombina) e ao PAR-4 que requer concentrações muito maiores de trombina do que o receptor PAR-1 [14]. A trombina medeia a formação de fibrina pelo fibrinogénio, contribuindo para a formação de uma rede de fibras elásticas que consolida o tampão plaquetar, transformando-o em tampão hemostático. O fibrinogénio liga-se com alta afinidade a integrina GPIIb/IIIa, agregando as plaquetas [13].

Na fase de perpetuação, os trombos ricos em plaquetas e a cascata de coagulação culminam na geração de um tampão de plaquetas estabilizado pela fibrina, nos locais da lesão [13].

Por último, uma breve referência sobre a trombose de endopróteses coronárias (stents). A trombose de stents pode ser classificada como aguda (<24 horas após o procedimento), subaguda (24 horas a 30 dias após o procedimento), tardia (31 dias a um 1 ano após o procedimento) e muito tardia (após um 1 ano do procedimento) [15]. Alguns factores que

explicam a trombose de stents foram identificados. Entre eles constam as características do paciente (idade avançada, interrupção prematura da terapia antiagregante plaquetar, resistência aos antiagregantes plaquetares, diabetes mellitus, doença renal crônica e baixa fração de ejeção do ventrículo esquerdo), características da lesão e características do procedimento. Em contrapartida, os factores de risco para o desenvolvimento de trombose de stents muito tardia não foram ainda bem definidos. Uma possível explicação para tal ocorrência é um atraso na formação do endotélio das artérias coronárias, após a colocação do stent [15].

4. Visão global da terapia antiagregante plaquetar

As doenças cardiovasculares representam a primeira causa de mortalidade e morbidade precoce no mundo industrial e têm se tornado um problema crescente em diversos países em vias de desenvolvimento. Assim, os antiagregantes plaquetares têm actualmente um lugar maior desde a fase aguda, em associação ou não às estratégias de reperfusão [16].

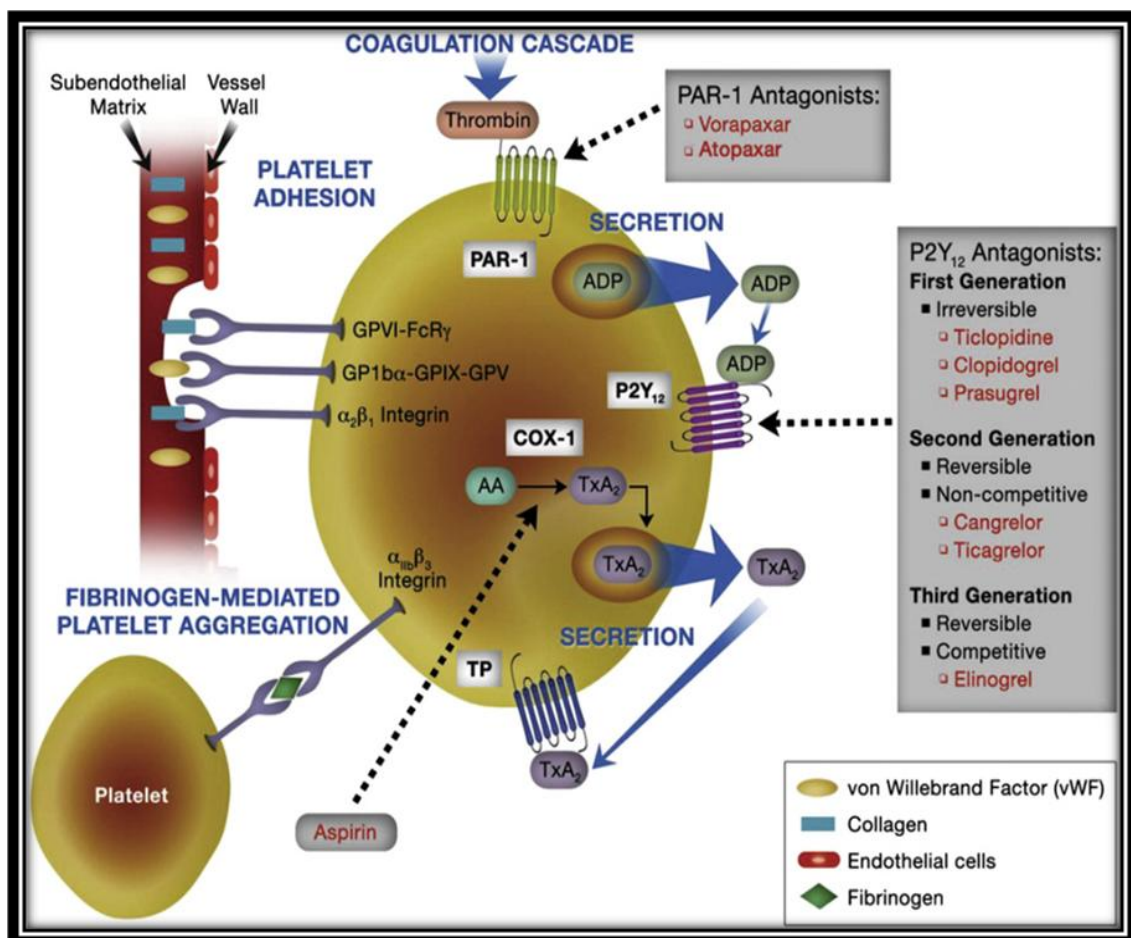


Figura 2: Mecanismo de acção dos antiagregantes plaquetares. Adaptado da referência [17].

A combinação do ácido acetilsalicílico (AAS) com um antagonista do receptor P2Y₁₂ (clopidogrel ou prasugrel) tem vindo a demonstrar eficácia clínica na redução da mortalidade e morbidade nos pacientes com doenças relacionadas com a aterosclerose [16].

O ácido acetilsalicílico (AAS) ou aspirina (ASA) é um inibidor irreversível da COX-1, reduzindo a produção de TXA₂. Ao prevenir a formação de TXA₂, AAS diminui a activação e a agregação plaquetar [13]. Numerosos estudos clínicos e meta-análises documentaram e comprovaram os benefícios do ácido acetilsalicílico em pacientes com síndrome coronário agudo (SCA). Um estudo, com 1266 homens com angina instável, mostrou o efeito protector do AAS contra o enfarte agudo do miocárdio [18]. Outro estudo pesquisou o benefício do AAS na redução de eventos isquémicos, nos pacientes submetidos a intervenção percutânea [19]. Uma redução significativa de eventos vasculares (enfarte de miocárdio, AVC...) foi observada em pacientes tratados com AAS, mas, no entanto, o seu uso aumentou o sangramento gastrointestinal e as hemorragias extracranianas [20]. Uma recente meta-análise demonstrou que o AAS reduz o risco de eventos vasculares oclusivos, inclusive o enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral isquémico, angina instável e estável e as complicações trombóticas e embólicas da doença arterial periférica e da fibrilhação auricular [21].

Os antagonistas do receptor P2Y₁₂ incluem a ticlopidina, o clopidogrel, o prasugrel e o ticagrelor e outros fármacos ainda em fase experimental (cangrelor e elinogrel). A ticlopidina, o clopidogrel e o prasugrel, representam três gerações de tienopiridinas que inibem de forma irreversível o receptor P2Y₁₂. Recentemente, antagonistas reversíveis do receptor P2Y₁₂ têm sido alvo de várias pesquisas, é o caso do ticagrelor (recentemente aprovado), do cangrelor (em fase III de investigação) e do elinogrel (em fase II de investigação) [13].

A ticlopidina representa a primeira geração de tienopiridinas. É metabolizado pelo citocromo P450 e deve ser tomada oralmente, duas vezes ao dia [13]. No estudo TASS (Ticlopidine Aspirin Stroke Study), a ticlopidina mostrou ser um pouco mais eficaz que o AAS para prevenir o risco de AVC. [22]. A ticlopidina apresenta importantes efeitos adversos tais como hemorragia, neutropenia e trombocitopenia. Por isso, foi substituída pelo clopidogrel que apresenta eficácia comparável à ticlopidina, após o implante de stent coronário, mas sem os riscos referidos anteriormente [23].

O clopidogrel é um pró-fármaco, metabolizado pelo citocromo P450, no fígado, para produzir o seu metabolito activo e deve ser tomado diariamente [13]. A eficácia clínica do clopidogrel foi demonstrada em diversos estudos. Foi demonstrado que é mais eficaz do que a aspirina, como terapia única antiagregante plaquetar na prevenção secundária de pacientes com doença vascular aterosclerótica (CAPRIE) [24]. Em combinação com o AAS, mostrou efeitos benéficos em pacientes com IAMSEST, IAM (CURE e COMMIT) e submetidos a intervenção percutânea (PCI-CURE). No entanto, o risco de hemorragias graves é maior nos pacientes tratados com clopidogrel [5, 6, 7]. Um dos grandes problemas do clopidogrel é a variação interindividual na resposta plaquetar. Isto deve-se a factores genéticos (polimorfismos do

CYP450,etc), interacções farmacológicas (com os inibidores da bomba de protões, por exemplo), factores celulares e factores clínicos próprios do paciente (obesidade,etc) [4].

O prasugrel é uma tienopiridina de terceira geração, aprovada em 2009 na Europa e nos EUA [13]. Mostrou efeitos antiagregantes mais potentes e consistentes, menor variabilidade interindividual na resposta plaquetar e início mais rápido do que o clopidogrel [25, 26]. Demonstrou benefícios clínicos em pacientes diabéticos e em pacientes com IAMEST que tenham realizado uma intervenção percutânea (TRITON-TIMI) [27, 28]. Contudo o prasugrel mostrou algumas limitações: aumento do risco de eventos hemorrágicos, baixos benefícios para pacientes que tenham tido um AVC ou um AIT e não é recomendado em pacientes com mais de 75 anos ou com menos de 60 kg [13].

O ticagrelor representa uma nova classe de antagonistas de P2Y₁₂, inibindo de forma reversível o receptor, tendo sido aprovado em 2010. Mostrou eficácia clínica em pacientes com síndromes coronárias e em comparação com o clopidogrel, exibe um grau mais elevado de inibição de plaquetas, é mais rápido e tem um efeito mais consistente nas plaquetas (DISPERSE - 2). Contudo, apresenta alguns riscos como a ocorrência de dispneia e pausas ventriculares [29, 30, 31].

Tabela 1: Agentes antiagregantes plaquetares orais aprovados pela FDA. COX-1, Ciclooxygenase-1; FDA, US Food and Drug Administration. Adaptado da referência [13].

Fármaco	Alvo	Mecanismo de acção	Posologia	Limitações	Aprovação
Aspirina	COX-1	Acção directa Irreversível	Diariamente	- Fraco antiagregante plaquetar	1998
Ticlopidina	P2Y ₁₂	Acção indirecta Irreversível	Duas vezes ao dia	- Mais efeitos colaterais do que o clopidogrel	1991
Clopidogrel	P2Y ₁₂	Acção indirecta Irreversível	Diariamente	- Variabilidade de resposta plaquetar interindividual	1997
Prasugrel	P2Y ₁₂	Acção indirecta Irreversível	Diariamente	- Maior risco de eventos hemorrágicos do que o clopidogrel - Contraindicado em pacientes com AVC ou AIT - Não recomendado em pacientes com mais de 75 anos e com menos de 60 Kg	2009
Ticagrelor	P2Y ₁₂	Acção directa Reversível	Duas vezes ao dia	- Dispneia e pausas ventriculares	2010

A terapia antiagregante plaquetar apresenta, contudo, diversas limitações: o risco residual de eventos trombóticos, o risco de eventos hemorrágicos e a variabilidade de resposta. O risco residual de eventos trombóticos deve-se ao facto do AAS e dos antagonistas da P2Y₁₂ inibirem unicamente as vias do TXA₂ e do ADP. No entanto, várias vias estão envolvidas na activação das plaquetas, permanecendo activas na presença dos agentes antiagregantes actuais. Isto aumenta o risco de eventos trombóticos em pacientes, permitindo a activação plaquetar contínua por agonistas potentes, tais como a trombina, expondo os pacientes a um maior risco de mortalidade e morbidade. Outra limitação substancial tem sido o risco de eventos hemorrágicos devido ao facto dos agentes antiagregantes (AAS e antagonistas P2Y₁₂) interferirem em duas vias essenciais para a hemostase primária. Por fim, como já referido

anteriormente, a variabilidade interindividual na resposta plaquetar é outra limitação importante. Isto deve-se ao facto dos agentes antiagregantes plaquetares não terem capacidade de inibir completamente as vias do ADP e do TXA_2 , devido a vários factores tais como: factores genéticos, celulares ou causas clínicas do paciente [32]. Tem sido amplamente enfatizado os conceitos de “resistência à aspirina” e de “resistência ao clopidogrel”, na literatura médica. Não há actualmente nenhuma definição padronizada ou amplamente aceite para definir o conceito de resistência. Uma definição exata de “resistência” com base na fisiologia ainda não está esclarecida mas parece estar associada à ocorrência de eventos clínicos futuros associados à oclusão vascular [33]. A resistência à aspirina deve-se a vários mecanismos entre os quais: polimorfismos da COX-1 e interações farmacológicas com anti-inflamatórios não-esteróides (ibuprofeno) [8]. Apresenta-se, a seguir, os mecanismos responsáveis pela variabilidade de resposta plaquetar do clopidogrel.

Tabela 2: Mecanismos responsáveis pela variabilidade de resposta plaquetar do clopidogrel. Adaptado da referência [32].

Factores Genéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Polimorfismo do MDR1 • Polimorfismo do CYP • Polimorfismo do P2Y_{12} • Polimorfismo do GPIIb/IIIa
Factores Celulares	<ul style="list-style-type: none"> • Renovação plaquetar acentuada • Aumento da exposição do ADP • Redução da actividade de CYP • Regulação excessiva do receptor P2Y_{12}
Factores Clínicos	<ul style="list-style-type: none"> • Falha na prescrição • Baixa adesão • Uso de baixas dosagens • Interações medicamentosas • Diabetes Mellitus • Síndromes coronários agudos • Elevado índice de massa corporal

Em resumo, apesar dos comprovados benefícios clínicos da actualidade, os agentes antiagregantes plaquetares orais estão associados a diversas limitações. Assim, torna-se necessário desenvolver novos agentes antiagregantes plaquetares, que permitam reduzir os eventos isquêmicos sem risco de eventos hemorrágicos.

Dois novos antagonistas reversíveis do receptor P2Y_{12} têm sido alvo de várias pesquisas, o cangrelor e o elinogrel. O cangrelor é um potente inibidor competitivo do receptor P2Y_{12} que é administrado por via intravenosa e rapidamente atinge uma inibição quase completa do ADP, inibindo assim a agregação plaquetar. O elinogrel pode ser administrado tanto por via

oral como por via intravenosa e é um potente inibidor do receptor P2Y₁₂, atingindo rapidamente uma quase completa inibição plaquetar [34, 35].

Os agentes antiagregantes plaquetares que visam inibir o receptor PAR-1 podem fornecer uma inibição plaquetar mais abrangente e benefícios clínicos incrementais, sem aumento do risco de sangramento. Portanto, a inibição do receptor PAR-1 representa uma abordagem racional para o desenvolvimento de novos agentes antiagregantes plaquetares. Dois inibidores do PAR-1 estão actualmente em desenvolvimento: Atopaxar (E555) (Eisai) e Vorapaxar (SCH530348) (Merk) [4].

Tabela 3: Agentes antiagregantes plaquetares em investigação. Adaptado da referência [13].

Fármaco	Alvo	Mecanismo de acção	Admistração	Posologia	Investigação
Cangrelor	P2Y ₁₂	Acção directa, Reversível	Intravenoso	Bolus ou Infusão	Fase III
Elinogrel	P2Y ₁₂	Acção directa Reversível	Intravenoso ou Oral	Duas vezes ao dia	Fase II
Vorapaxar (SCH 530348)	PAR-1	Competitivo Reversível	Oral	Diariamente	Fase III
Atopaxar (E5555)	PAR-1	Competitivo Reversível	Oral	Diariamente	Fase II

Por último, uma breve referência aos inibidores da glicoproteína IIb/IIIa (abciximab, eptifibatide e tirofiban) que actuam na via final da activação das plaquetas. Estudos em doentes programados para intervenção coronária percutânea mostraram que uma combinação de inibidores da glicoproteína IIb/IIIa intravenosos com aspirina e heparina está associada a uma maior redução da morte e do infarte do miocárdio, do que com a aspirina e a heparina sozinhos. As principais limitações destes fármacos são o risco de hemorragia e de trombocitopenia [36].

5. Métodos de estudo laboratoriais da hemostase primária

5.1 Agregometria

A técnica de agregometria baseada na medição turbidométrica da agregação plaquetar, foi desenvolvida em 1960 e revolucionou a capacidade de identificar e diagnosticar alterações na função plaquetar [9].



Figura 3: Agregómetro de 4 canais baseado na medição turbidométrica da agregação plaquetar em amostras de plasma rico em plaquetas. Adaptado da referência [37].

Nesta técnica o sangue é centrifugado a força suficientemente baixa para se obter plasma rico em plaquetas. O plasma resultante é agitado numa cuvete a 37 °C, entre uma fonte de luz e uma célula fotoelétrica de medição. De acordo com esta metodologia, as plaquetas são expostas a agentes agregantes, tal como o ADP ou o colagénio, que estudam o estado funcional dos distintos elementos que participam na função plaquetar. O agregado de plaquetas resultante aumenta a transmissão de luz, que é detectada e registada em função do tempo, após adição do reagente. O padrão agregométrico resultante permite identificar o defeito funcional: défice ou anomalia das glicoproteínas de membrana, defeitos do armazenamento ou secreção dos grânulos ou metabolitos [9, 37].

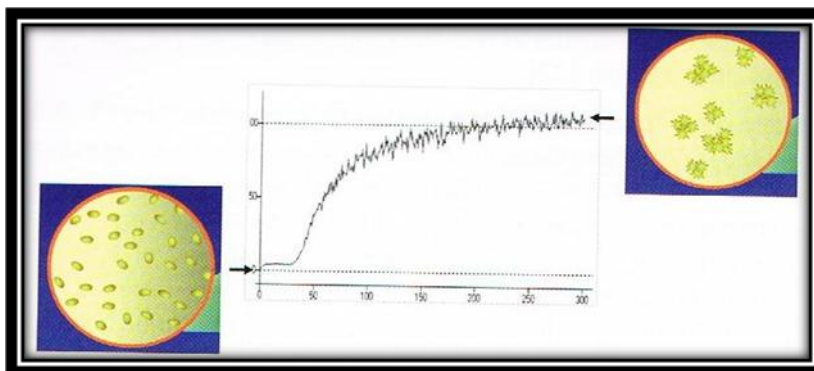


Figura 4: Traçado agregométrico em plasma rico em plaquetas activado por colagénio como agente agonista. Adaptado da referência [37].

Uma grande quantidade de informação valiosa pode ser obtida através da agregometria, embora o teste seja trabalhoso, requeira um controlo de qualidade cuidadoso e um grau elevado de especialização por parte de quem desempenha a técnica e interpreta os resultados. Para além disto, existe uma certa dificuldade em padronizar os estudos de agregometria entre os diferentes laboratórios. Conscientes de esta problemática, existem uma série de esforços para melhorar a padronização da técnica, incluindo novas orientações [9, 37]. Algumas limitações adicionais têm-se verificado no uso desta técnica. A agregometria turbidométrica subestima tanto a intensidade como a duração do efeito dos antagonistas do receptor GPIIb/IIIa [38]. Para além disto, a técnica é relativamente insensível tanto para a detecção de agregados pré-existentes como para o controlo da fase inicial da agregação, não se recomendando a utilização desta técnica para identificação de pacientes com trombose [39]. Por fim, estes estudos orientam sobre os defeitos funcionais das plaquetas, mas o diagnóstico preciso da disfunção plaquetar requer a utilização de outras técnicas [37].

Em resposta às dificuldades acima referidas, foi desenvolvido uma nova técnica de medição da agregação plaquetar por impedância eléctrica. Neste método, o sangue total é agitado a 37 °C entre dois eléctrodos de platina fixados a uma distância fixa. As plaquetas aderem aos eléctrodos, com adesão adicional dos agregados de plaquetas, após adição dos agonistas. A deposição de plaquetas sobre os eléctrodos origina variações eléctricas que são registadas eletronicamente. Esta técnica supera o método clássico de agregometria, para monitorizar a terapia antiagregante plaquetar [9].

5.2 Tromboelastografia - TEG

A tromboelastografia (TEG) é um método laboratorial, originalmente descrito em 1948, permitindo uma avaliação global do processo de iniciação, formação, estabilização e lise do coágulo. As alterações viscoelásticas que ocorrem durante a coagulação são registadas, fornecendo uma representação gráfica do processo de polimerização de fibrina e também da força do coágulo [9].

A amostra de sangue é colocada a 37 °C numa cuvete, sendo que dentro dela é suspenso um pino conectado a um sistema de detecção. Os movimentos de rotação da cuvete são transmitidos para o pino e o grau de rotação do pino é convertido num sinal eléctrico que é monitorizado através de um registador gráfico. A amostra de sangue é colocada na cuvete e a medida que se forma o coágulo, as fibras de fibrina ligam as paredes da cuvete ao pino aumentando a magnitude do sinal, enquanto que durante a lise do coágulo as ligações entre a cuvete e o pino são quebradas e o sinal cai. O dispositivo ROTEM® (Tromboelastometria) é uma adaptação do TEG em que a cuvete permanece imóvel e o pino é que roda directamente na amostra. Os resultados obtidos são essencialmente idênticos ao TEG [9].

Este método tem sido usado, principalmente na avaliação pré-operatória, especialmente em trauma e em transplante hepático. É útil, igualmente, para previsão de eventos tromboembólicos em pacientes cirúrgicos e para rastreio de alterações da coagulação [9].

Os trabalhos iniciais usando esta técnica não mostraram alterações nos parâmetros tromboelastográficos, após a ingestão de ácido acetilsalicílico [9]. Recentemente, com as modificações implementadas, com a associação de ADP e ácido araquidónico, esta metodologia laboratorial mostrou ser um método útil para a avaliação da terapia antiagregante plaquetar. Contudo observa-se a necessidade de trabalhos adicionais para comprovar a eficácia desta técnica para estudo dos antiagregantes plaquetares [40].

5.3 VerifyNow Assay® (Rapid platelet function analyser - RPFA)

Este dispositivo surgiu no contexto da monitorização do bloqueio dos receptores das plaquetas por parte dos antiagregantes plaquetares. Dados clínicos sugerem que é necessário um bloqueio de mais de 80 % dos receptores das plaquetas para atingir eficácia clínica com estes agentes. Assim torna-se imperioso a monitorização da terapêutica antiagregante plaquetar, a fim de assegurar a dosagem óptima e benefício clínico para os doentes em risco de desenvolver complicações isquémicas. Como já referido anteriormente, a agregometria é uma técnica morosa, dispendiosa, exige um grau de conhecimento técnico e um controlo de qualidade elevado. Assim tornou-se necessário desenvolver um método simples, barato e rápido [9].



Figura 5: VerifyNow Assay®. Adaptado da referência [41].

Este teste permite controlar a terapia antiagregante plaquetar, sendo que três dispositivos foram desenvolvidos. Um deles foi desenvolvido para testar os antagonistas da GPIIb/IIIa. O princípio baseia-se na utilização de cartuchos descartáveis com esferas de fibrinogénio e um activador de plaquetas (Peptídeo activador do receptor de trombina - PART) que vai contactar com uma amostra de sangue inserida no cartucho. O PART activa as plaquetas, o que resulta na exposição e ligação do fibrinogénio aos receptores GPIIb/IIIa das plaquetas que não foram bloqueados com o fármaco. Os resultados da percentagem de inibição dos receptores ficam disponíveis em poucos minutos. Existem outros dois cartuchos, um para testar a aspirina e outro para antagonistas do receptor P2Y₁₂, respectivamente, com ácido araquidónico e ADP [9].

Este método mostrou ser útil no estudo da antiagregação plaquetar e estudos recentes comprovam este facto [42-48].

Relativamente às tienopiridinas, um recente estudo mostrou que 48,5 % dos 99 pacientes submetidos a intervenção coronária percutânea estudados, não apresentavam resposta plaquetar ao clopidogrel, demonstrando que a técnica VerifyNow permite detectar eficazmente a resposta plaquetar ao clopidogrel [42]. Outro estudo avaliou 57 pacientes com IAM submetidos a intervenção coronária percutânea e medicados com clopidogrel. Este estudo avaliou a resposta plaquetar ao clopidogrel em 3 momentos: no hospital, 30 dias e 6 meses após a intervenção coronária percutânea. Verificou, respectivamente, alta reactividade plaquetar em 38,6%, 28,1% e 33,3% dos pacientes, demonstrando, assim, que a alta reactividade plaquetar parece ser relativamente estável até aos 6 meses após o IAM [43]. Para além do estudo do clopidogrel, outras tienopiridinas mais recentes têm sido alvo de estudos com esta técnica, entre as quais o ticagrelor e o prasugrel [44,45]. Relativamente ao ticagrelor, a técnica demonstrou ser eficaz para avaliar os efeitos deste fármaco nas plaquetas e identificar reactividade plaquetar elevada com o tratamento [44]. Relativamente ao prasugrel, foi demonstrado, em pacientes com SCA, que a reactividade plaquetar após o tratamento era mais baixa com o prasugrel do que com o clopidogrel [45].

Relativamente à aspirina, recentes estudos detectaram resistências a este fármaco e correlacionaram este facto com futuros eventos adversos [46, 47]. Um estudo em 106 pacientes com AVC isquémico mostrou que a resistência à aspirina é comum nestes pacientes e associa-se a um aumento de mortalidade a curto e a longo prazo [46]. Outro estudo seguiu, durante pelo menos 4 semanas, 314 pacientes com SCA, tratados com 75-300 mg de aspirina. Dos 314 pacientes, 30 (9,6 %) apresentaram resistência à aspirina e esta resistência estava associada a eventos cardíacos adversos [47].

A combinação da aspirina com o clopidogrel também foi estudada, pela técnica VerifyNow [48]. Um estudo demonstrou que os pacientes que mantinham uma alta reactividade plaquetar com o tratamento aspirina e/ou clopidogrel apresentavam um número mais elevado de trombose de stents. Esta resistência podia ser melhorada aumentando a dose dos antiagregantes plaquetares [48].

5.4 Platelet Function Analyser® - PFA-100

5.4.1 Descrição da técnica

O tempo de sangria ou tempo de hemorragia é uma prova que permite a avaliação global da hemostase primária e é a única prova que se realiza in vivo. Esta prova é considerada uma prova imprecisa e invasiva. Desenvolveu-se, em 1995, um teste simples, rápido e que não requer formação especializada, o analisador da função plaquetar PFA-100. Esta técnica leva a cabo um tempo de sangria in vitro, possibilitando uma informação similar ao tempo de sangria in vivo de uma forma mais confiável e mais sensível para detectar potenciais alterações da hemostase primária. Para além de revelar alterações a nível da hemostase, permite (tal como o tempo de hemorragia in vivo) uma contagem completa de plaquetas e hematócrito no sangue [37].

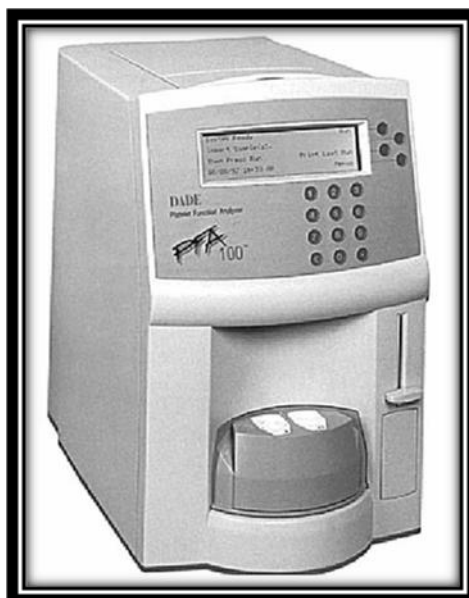


Figura 6: PFA-100 - Analisador da função plaquetar. Adaptado da referência [60].

Este sistema consiste numa bomba de aspiração controlada por um microprocessador e uns sensores que detectam alterações nas pressões de aspiração. A pressão negativa constante aspira a amostra de sangue citratado (anticoagulado), desde um reservatório de amostra através dos capilares e da abertura de uma membrana, onde as plaquetas estão sujeitas a tensões de corte elevadas. O sangue que circula pelo capilar contacta com uma abertura central (150 μ m de diâmetro) de uma membrana recoberta com colagénio e ADP (cartucho Col-ADP) ou colagénio e adrenalina (cartucho Col-EPI). A presença destes estímulos bioquímicos e as taxas de cisalhamento elevadas, resultam na activação das plaquetas, agregação e, lentamente, na construção de um tampão de plaquetas estável na abertura, diminuindo assim gradualmente o fluxo sanguíneo, parando-o finalmente. O sistema PFA-100

determina o tempo desde o início do teste até o tampão de plaquetas fechar o orifício. Este intervalo de tempo é chamado tempo de fecho (CT). O tempo de fecho é um indicador da capacidade hemostática das plaquetas na amostra de sangue analisada [37].

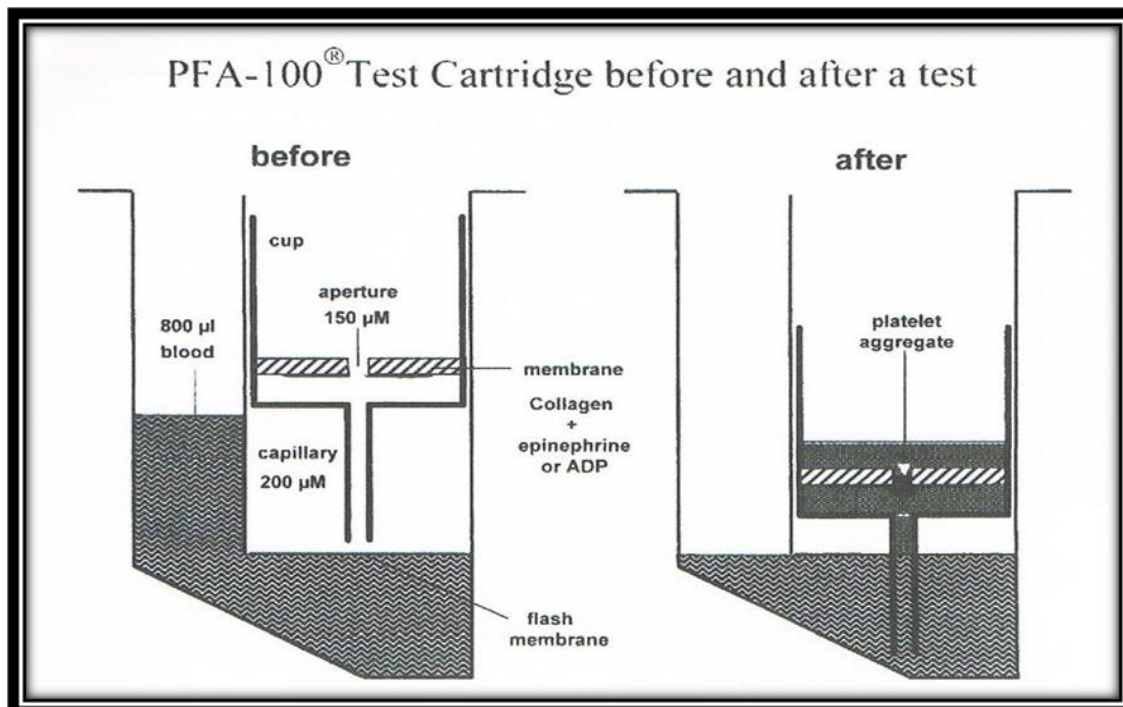


Figura 7: Princípio do método PFA-100: A amostra de sangue anticoagulado é aspirada a partir de um reservatório para um capilar e contacta com a abertura de uma membrana. As plaquetas aderem, activam-se e finalmente formam um agregado de plaquetas. O instrumento calcula o tempo desde o início do ensaio até à formação do tampão hemostático que obstrui a abertura, a isto designamos o tempo de fecho. Adaptado da referência [60].

Relativamente aos valores de referência, o tempo de fecho máximo fornecido pela técnica é de 300 segundos. Considera-se que qualquer valor superior a 250 - 300 segundos seja equivalente à incapacidade de encerramento da abertura central da membrana. Os valores de referência para o tempo de obturação para dadores saudáveis oscilam entre os 71-118 segundos para os cartuchos de Col-ADP e entre os 85 e 165 segundos para os cartuchos de Col-EPI. Estes valores apresentam algumas variações nas diferentes publicações, embora sejam bastante semelhantes [49].

5.4.2 Variáveis externas

O tempo de fecho é uma indicação de disfunção plaquetar mas este tempo não é específico para qualquer doença não devendo ser usado para efeitos de rastreio geral sem o conhecimento de outras variáveis que influenciam o ensaio. Apresenta-se a seguir algumas das variáveis que podem alterar o tempo de fecho, na técnica PFA-100.

Um estudo, realizado com 309 dadores de sangue saudáveis, avaliou o efeito do sexo, do tabagismo e dos contraceptivos orais. Nem o sexo nem o uso de contraceptivos orais tiveram qualquer efeito sobre a hemostase primária. Um valor ligeiramente mais elevado no tempo de fecho do cartucho Col-EPI foi observado nos fumadores relativamente aos não fumadores (este efeito foi mais pronunciado no sexo feminino relativamente ao sexo masculino) [50].

Outro ensaio realizado em 62 indivíduos aparentemente saudáveis, não evidenciou diferença significativa do tempo de fecho entre homens e mulheres e também não mostrou diferenças significativas entre os mais jovens e os mais velhos do que 55 anos, apesar de existir uma tendência para valores mais curtos em homens mais velhos (mais de 55 anos) comparativamente aos homens mais novos. Neste estudo não houve correlação significativa entre o tempo de fecho e o hematócrito, a contagem de plaquetas ou de leucócitos [51]. Os neonatos apresentam valores de tempo de fecho menores do que os adultos saudáveis, devido a concentrações maiores de vWF [52].

Relativamente aos dadores de plaquetas, estes apresentam um tempo de fecho prolongado devido provavelmente à diminuição da formação de tromboxano e à doação frequente de plaquetas [53]. O sistema ABO também influencia o tempo de fecho, sendo que os indivíduos com grupo O de sangue apresentam um tempo de fecho maior, devido, provavelmente, a menores níveis de vWF no plasma [54].

Um hematócrito baixo, uma baixa contagem de plaquetas e de leucócitos podem correlacionar-se com elevados tempos de fecho [49].

Um estudo de K.W.von Pape et al, realizado com 214 pacientes, após interrupção da terapia com 100 mg/dia de aspirina, mostrou que a análise da função plaquetar, através da técnica PFA-100, depende fortemente da concentração de citrato de sódio utilizado para anticoagulação da amostra de sangue, recomendando-se o uso de 0,129 M de citrato de sódio [55]. Já o uso da heparina não influencia o tempo de fecho [56].

Tabela 4: Teste PFA-100 em pacientes após interrupção da terapia ASA vs grupo de controlo sem uso de ASA - Relação entre o tempo de fecho nos dois cartuchos e o citrato de sódio usado como anticoagulante. Adaptado da referência [55].

	CT in seconds, median (5-95 percentiles) ^a					
	Controls	Patients, days after cessation of ASA				
		<1 day	1-2 days	2-3 days	3-4 days	>4 days
Sample size (n)	20	80	65	30	20	59
Coll/Epi-cartridge						
SC 0.129 M	97 (84-156)	297 (153-300) <i>p</i> <0.001	289 (108-300) <i>p</i> <0.001	263 (102-300) <i>p</i> <0.001	176 (77-300) <i>p</i> <0.001	142 (87-288) <i>p</i> =0.022
SC 0.106 M	114 (76-132)	273 (106-300) <i>p</i> <0.001	162 (87-300) <i>p</i> <0.001	139 (86-300) <i>p</i> =0.001	136 (68-296) <i>p</i> =0.028	121 (79-280) ns ^b
Coll/ADP-cartridge						
SC 0.129 M	89 (59-119)	96 (67-159) ns	97 (60-159) ns	90 (64-155) ns	84 (62-212) ns	82 (63-124) ns
SC 0.106 M	89 (41-107)	84 (57-129) ns	83 (55-145) ns	78 (56-130) ns	71 (54-138) ns	75 (56-117) ns

^a *p* values of median CTs were calculated between the respective control group and the patients for both types of cartridges and anticoagulants.
^b ns, non-significant (*p*>0.05).

Relativamente aos doentes com cirrose e com doença urémica, o tempo de oclusão apresenta-se prolongado, devido, provavelmente, à anemia apresentada por estes pacientes [57].

A dieta também pode influenciar o tempo de fecho. O consumo de alimentos ricos em flavonoides (o vinho tinto, o cacau e o chocolate, por exemplo) pode prolongar o tempo de fecho do cartucho Col-EPI [54].

Chakroun et al mostraram, em pacientes com doença cardiovascular tratados com aspirina, que o tempo de fecho na técnica PFA-100 é altamente influenciado por altos níveis plasmáticos de vWF [58]. O tempo de fecho, em pacientes com doença coronária aguda tratados com aspirina, está bastante encurtado, devido ao facto destes pacientes apresentarem valores mais elevados de vWF no plasma [8]. A necrose do miocárdio pode explicar o aumento de vWF e conseqüentemente os curtos tempos de oclusão em ambos os cartuchos [54].

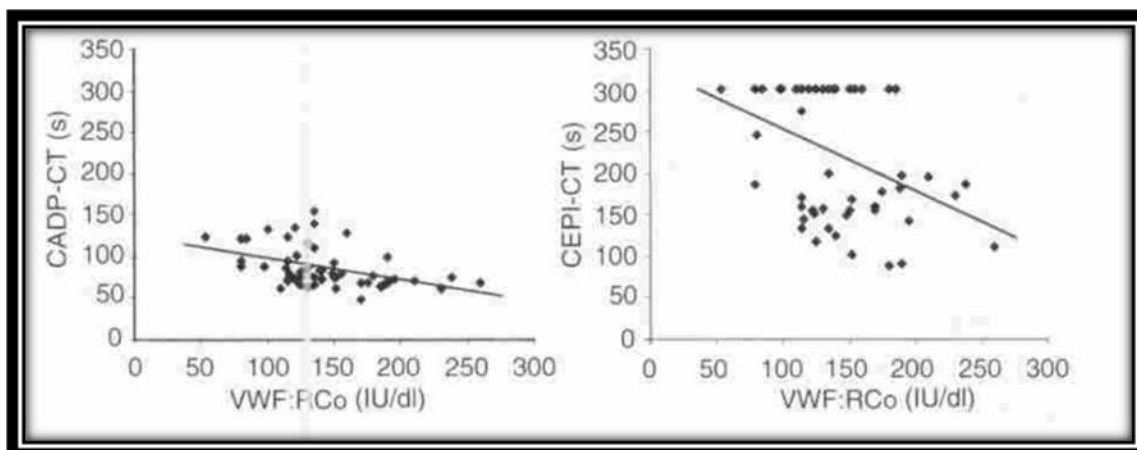


Figura 8: Relação entre o factor von Willebrand e o tempo de fecho nos cartuchos de Col-ADP e Col-EPI. Adaptado da referência [58].

Se o teste for normal, é altamente provável que o paciente não tenha qualquer defeito grave da função plaquetar e não será necessário a realização de outros testes. No entanto, os resultados normais não podem excluir sempre defeitos leves na função plaquetar. Assim se a suspeita de algum defeito plaquetar for elevado, recomenda-se a realização de mais meios complementares de diagnóstico. A técnica PFA-100 é útil como um sistema de rastreio para a função plaquetar, qualquer valor anormal deve ser, igualmente, mais plenamente investigado, visto não diagnosticar, nem ser específico para qualquer desordem em particular [54].

5.4.3 Uso clínico

A técnica PFA-100 é uma ferramenta relativamente recente para investigação da hemostase primária e tem mostrado a sua utilidade na avaliação e no diagnóstico de várias entidades clínicas. O teste é bastante útil como ferramenta de rastreio para investigar possível doença de von Willebrand e outros distúrbios plaquetares, tais como defeitos na secreção de plaquetas [49]. Também mostrou a sua utilidade e potencial no acompanhamento da terapia com desmopressina usada em vários distúrbios plaquetares [49]. Mais recentemente, a técnica PFA-100 tem mostrado interesse para estudo de diferentes classes de antiagregantes plaquetares, entre os quais, os inibidores da glicoproteína IIb/IIIa, as tienopiridinas e a aspirina [49]. É neste aspecto que esta monografia se vai concentrar.

Relativamente à terapêutica com os inibidores da GPIIb/IIIa, vários estudos evidenciaram a eficácia do uso da técnica PFA-100 na monitorização do tratamento com estes agentes antiagregantes. Mostrou-se um aumento do tempo de fecho em ambos os cartuchos (Col-EPI e Col-ADP) em pacientes que tomavam inibidores da GPIIb/IIIa [56, 59-61]. Madan et al concluíram, num estudo com 250 pacientes tratados com abciximab ou eptifibatide durante intervenção coronária percutânea, que existem diferenças entre os diferentes agentes na fase de recuperação. Pacientes tratados com eptifibatide mantêm uma inibição plaquetar profunda, 4 a 6 horas após a interrupção do tratamento, mantendo-se até às 24 horas após descontinuação do fármaco. Enquanto que com o abciximab, se observou uma recuperação da função plaquetar a partir das 12 horas após descontinuação do fármaco, sendo que a maior parte dos pacientes apresentavam resultados de tempo de fecho normais, às 24 horas. Estes achados sugerem uma importante distinção entre ocupação e função de receptores do abciximab, isto é, enquanto 58 % dos receptores estavam ocupados, 61 % dos pacientes apresentavam valores normais de tempo de fecho, na técnica PFA-100, após 24 horas [59].

Tabela 5: Tempo de fecho medido durante a terapia com os inibidores da GPIIb/IIIa. Adaptado da referência [59].

Timepoints	Pts	Median CT, s (25th, 75th)	% Nonclosure n (%)	% Abnormal n (%)	% Normal n (%)
Abciximab†					
Baseline	211	85 (73, 100)	0	12 (6)	198 (94)
10 min	211	300 (300, 300)	206 (98)	3 (1)	2 (1)
4 h*	25	300 (300, 300)	25 (100)	0	0
12 h	177	300 (300, 300)	165 (93)	6 (3)	6 (3)
24 h	183	107 (90, 300)	50 (27)	21 (11)	112 (61)
Eptifibatide†					
Baseline	23	85 (72, 93)	0	3 (13)	20 (87)
10 min	23	300 (300, 300)	23 (100)	0	0
4 h	19	300 (300, 300)	19 (100)	0	0
24 h	12	300 (210, 300)	9 (75)	0	3 (25)

For each timepoint, the number of patients with valid samples is indicated (Pts). CT, Closure time; Nonclosure, closure time ≥ 300 seconds; Abnormal, closure time ≥ 130 seconds but < 300 seconds; Normal, closure time < 130 seconds.
*Only the first 25 patients treated with abciximab had a 4-hour sample measured, as part of pharmacodynamic comparison with platelet aggregation and receptor occupancy studies.¹¹
†Anticoagulant for patients treated with abciximab was sodium citrate. For patients treated with eptifibatide, data shown for PPACK specimens only.

Outro estudo de Mandan et al demonstrou o mesmo facto, em que, enquanto 58 % dos receptores de abciximab estavam ocupados, 72 % dos pacientes já tinham um tempo de fecho normal (<130s) no fim das 24 horas [60]. Foi igualmente demonstrado, que os pacientes que não atingiam o máximo de inibição plaquetar no fim dos 10 min podiam ter um risco aumentado de eventos cardíacos adversos ao longo dos próximos 6 meses [59].

Quanto as tienopiridinas, numerosos estudos mostraram que a técnica PFA-100 não é eficaz na monitorização de pacientes tratados com clopidogrel ou ticlopidina [62-66]. Em contraste, alguns estudos mostraram que a técnica PFA-100 é útil no estudo de um subconjunto de pacientes com AVC, tratados com clopidogrel [67]. Grau et al realizaram um estudo com 31 pacientes, com história de AVC, que foram tratados com aspirina ou clopidogrel, ou com ambos os fármacos, durante 4 semanas. Observaram, que o tempo de fecho com o cartucho de Col-EPI estava prolongado com a aspirina e com a aspirina mais o clopidogrel, comparado com o clopidogrel em monoterapia. O tempo de fecho com o cartucho Col-ADP estava igualmente aumentado com o uso combinado da aspirina e do clopidogrel, comparado com a aspirina e com o clopidogrel em monoterapia [67].

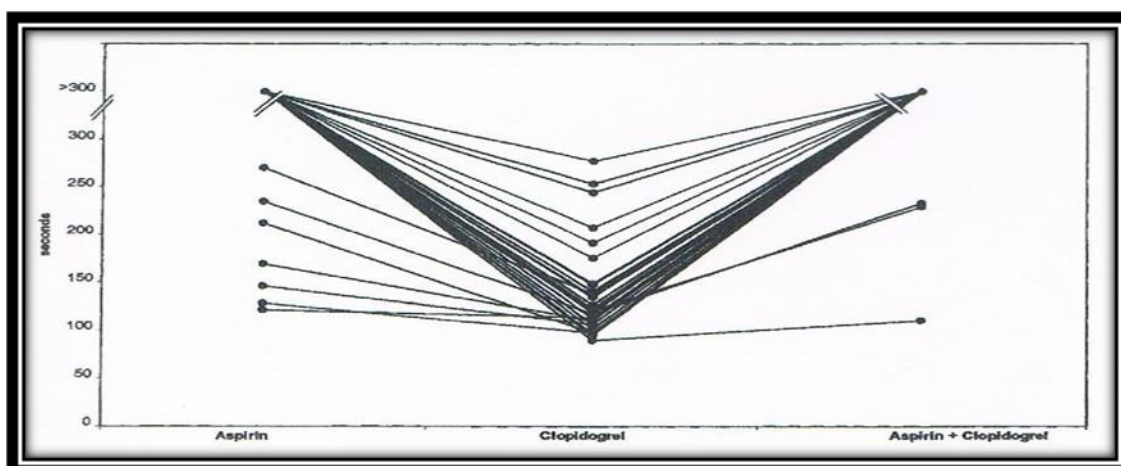


Figura 9: Tempo de fecho no cartucho Col-EPI com a técnica PFA-100 com o tratamento com aspirina, clopidogrel e ambos. Adaptado da referência [67].

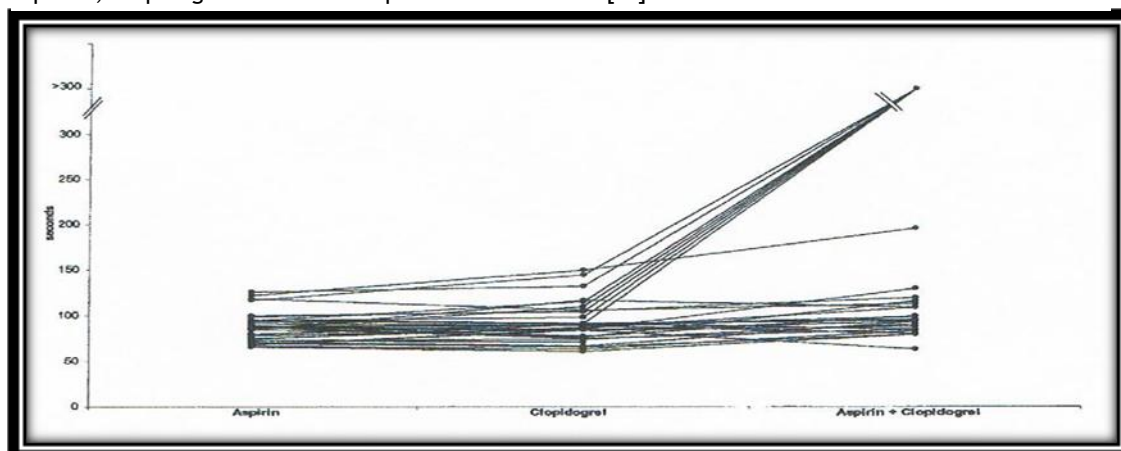


Figura 10: Tempo de fecho no cartucho Col-ADP com a técnica PFA-100 com o tratamento com aspirina, clopidogrel e ambos. Adaptado da referência [67].

Estes achados mostram um sinergismo nos efeitos antiagregantes plaquetares da aspirina e do clopidogrel, quando usados em conjunto [67]. Este sinergismo foi detectado em outros estudos, inclusive num estudo de Mueller et al, realizado em 154 pacientes com doença cardiovascular [66]. Em contraste, outros estudos evidenciaram que em doentes submetidos a angioplastia coronária percutânea, a combinação da ticlopidina com a aspirina não aumentou o tempo de fecho no cartucho Col-ADP comparado com a aspirina em monoterapia [56].

A técnica PFA-100 mostrou-se igualmente eficaz a prever resultados adversos em doentes após intervenção percutânea nos membros inferiores. Um estudo de Ziegler et al, seguiu, durante os 12 meses após a realização da angioplastia, um grupo de 98 pacientes com doença arterial obstrutiva periférica e mostrou que os pacientes que não respondiam ao clopidogrel (tempo de fecho curto) tinham um elevado risco de desenvolver complicações após a realização da angioplastia nos membros inferiores [68].

Tabela 6: Relação entre a recorrência de doença e a resposta à terapia antiagregante plaquetar. Adaptado da referência [68].

		Houve recorrência	Não houve recorrência
Terapia com ASA (n=52)	Não-responderam (n=5)	0	5
	Responderam (n=47)	13	34
Terapia com clopidogrel (n=34)	Não-responderam (n=11)	6	5
	Responderam (n=23)	3	20
Terapia combinada (n=34)	Não-responderam (n=0)	0	0
	Responderam (n=12)	3	9

A técnica PFA-100 foi proposta para analisar o efeito plaquetar da aspirina e mostrou ser uma técnica relativamente sensível para o seu estudo. Nos pacientes que ingeriram aspirina o tempo de fecho no cartucho de Col-EPI estará prolongado, ao contrário do tempo de fecho no cartucho de Col-ADP que será menos afectado [69,70].

Esta técnica tem sido usada cada vez mais para estudo dos efeitos da aspirina em pacientes com doença cardiovascular, tais como síndromes coronários agudos, doença arterial periférica ou doença cerebrovascular, como se passa a descrever.

Como referido anteriormente, múltiplas variáveis influenciam o estudo, entre as quais a dose de aspirina usada. Um estudo realizado com 129 pacientes com doença cerebrovascular evidenciou que os pacientes tratados com baixa dose de aspirina (162mg/dia) tinham funções plaquetares normais comparadas com às dos pacientes medicados com alta dose de aspirina

(≥325 mg/dia) [71]. As diferentes formulações de aspirina usadas também mostraram alterações a nível da função plaquetar. Os pacientes tratados com aspirina revestida apresentaram tempos de fecho menores comparado com os pacientes medicados com aspirina não revestida [71].

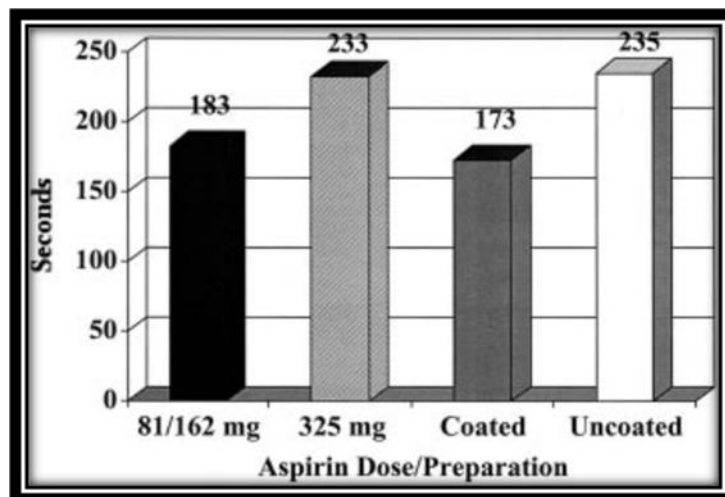


Gráfico 1: Diferenças entre as duas doses de aspirina e as duas preparações de aspirina, no tempo de fecho. Adaptado da referência [71].

Estes dados foram recentemente confirmados por um estudo realizado em 159 pacientes da cardiologia, tratados com 100 mg/dia ou 300 mg/dia de aspirina. Foram observadas diferenças na inibição plaquetar de acordo com a dose usada. A prevalência de inibição plaquetar incompleta nos pacientes tratados com 100 mg/dia de aspirina foi significativamente superior (30,4 %), em comparação com os doentes tratados com 300 mg/dia (13.8 %) [72].

Tabela 7: Relação entre os factores clínicos e laboratoriais e os resultados da técnica PFA-100 dos grupos de pacientes que receberam 100 mg/dia e 300 mg/dia de aspirina. Adaptado da referência [72].

	Aspirin 100 mg/day (n=79)			Aspirin 300 mg/day (n=80)			p
	n	%	Mean±SD	n	%	Mean±SD	
Age (years)			61.5±10.3			60.3±9.4	0.437
Sex (Females)	42	53.2		34	42.5		0.205
Hypertension	50	63.3		49	61.3		0.764
Diabetes mellitus	18	22.8		26	32.5		0.215
Hyperlipidemia	53	67.1		46	57.5		0.253
Coronary artery disease	37	46.8		45	56.3		0.268
Statin	35	44.3		37	46.3		0.739
ACE inhibitors	21	26.6		18	22.5		0.709
Beta-blocker	25	31.7		33	41.3		0.122
Calcium channel blockers	19	24.1		15	18.8		0.558
Hemoglobin (g/dl)			13.7±1.6			13.7±1.7	1.0
PFA-100 results							
Platelet count (x10 ⁹ /Kmm ³)			244,350			235,760	0.872
Incomplete platelet inhibition	24	30.4		11	13.8		0.013
CEPI closure time (sec)			229±76			259±65	0.009
CEPI closure time >300 sec	37	46.8		50	62.5		0.056

ACE: Angiotensin converting enzyme; CEPI: Collagen/epinephrine; PFA: Platelet function analyzer.

Outra investigação, em doentes com doença arterial periférica, não mostrou alterações significativas na função plaquetar entre as diferentes doses usadas (100 mg e 300mg) [73].

Relativamente à duração dos efeitos plaquetares da aspirina, um estudo realizado em pacientes voluntários que tomaram 300 mg/dia ou 75 mg/dia, demonstrou uma tendência para aumento do sangramento persistente durante 5 dias e não houve alterações significativas entre as doses (75 mg e 300 mg) [74].

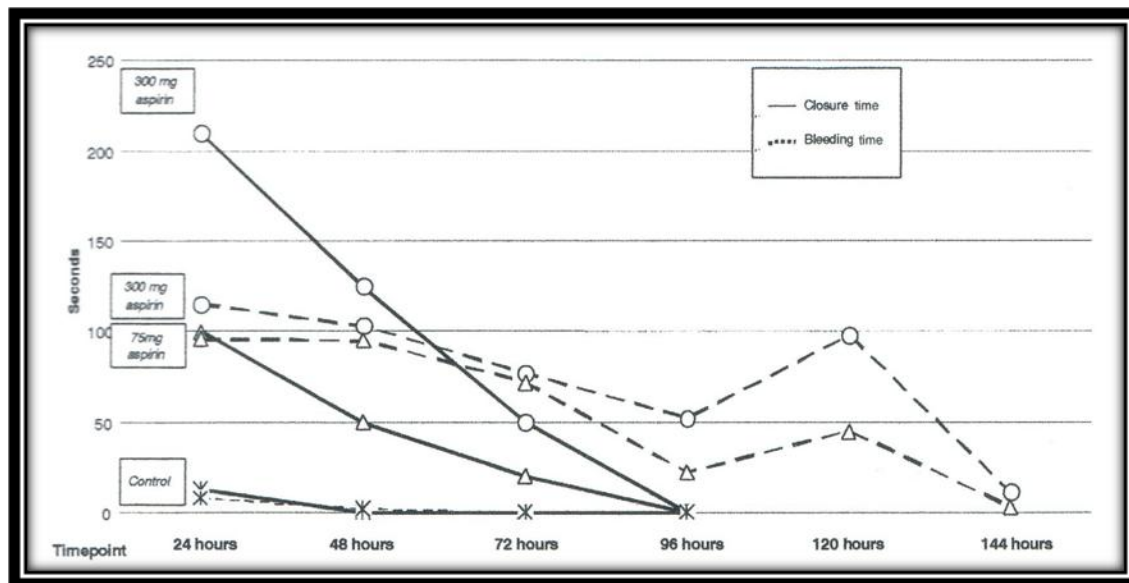


Figura 11: Média do prolongamento dos testes de cada indivíduo (tempo de sangramento e de oclusão) em cada ponto de tempo medido. Adaptado da referência [74].

Usando a técnica PFA-100, percentagens elevadas de resistência à aspirina foram referidas ao analisar os diferentes tempos de fecho. Referem-se alguns estudos que comprovaram este facto.

Num estudo realizado em 202 pacientes com enfarte agudo do miocárdio verificou-se que em 35 % dos pacientes tratados com aspirina em monoterapia não se verificou aumento do tempo de fecho; o mesmo aconteceu em 40 % dos pacientes com a combinação da aspirina e varfarina [75]. Outro estudo demonstrou, num grupo de 325 pacientes com doença cardiovascular (doença arterial periférica, doença vascular cerebral e pacientes cardíacos), que 5 a 9 % dos pacientes apresentavam resistência completa à aspirina enquanto 23 % tinham uma resposta parcial [76]. Um estudo realizado em 40 pacientes com doença coronária também detectou 9 pacientes resistentes à aspirina (22,5 %), 4 dos quais se tornaram sensíveis após alteração da dose da aspirina [77]. Uma investigação em doentes com doença arterial periférica também demonstrou que 40 % dos pacientes apresentavam resistências [73]. Este dado foi refutado noutro estudo que demonstrou que a prevalência de resistência em doentes com doença arterial periférica era baixa, embora houvesse discrepância entre o

método PFA-100 e a agregometria [78]. Diferenças entre os dois métodos foram descritas em outros estudos [79].

A bibliografia refere que o aumento da resistência à aspirina leva a um aumento de eventos adversos no futuro. Um estudo em pacientes com enfarte do miocárdio encontrou um número maior de eventos adversos recorrentes nos pacientes que não responderam à aspirina, relativamente aos que responderam (36% versus 24 %), embora estas diferenças não fossem estatisticamente significativas [75].

Tabela 8: Eventos clínicos adversos de acordo com o grau de resposta à aspirina. Adaptado da referência [75].

	Responders		Non-responders		<i>p</i>
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	
Non-fatal myocardial infarction or thromboembolic stroke	4/46	8.7	3/25	12	0.691
Revascularization	9/46	19.6	9/25	36	0.128
Any clinical non-fatal event	11/46	23.9	9/25	36	0.280

Number of patients suffering a clinical event in the group of patients treated with aspirin alone (*n* = 71), after a mean observation period of 4 years.
p values refer to differences between responders and non-responders.

Outro estudo demonstrou que a ocorrência de eventos cardiovasculares adversos em pacientes que tenham realizado intervenção coronária percutânea era maior nos que mantinham reactividade residual de plaquetas [80]. Uma recente meta-análise mostrou que os pacientes que são resistentes à aspirina (caracterizados como tendo um tempo de fecho curto no cartucho Col-EPI) estão em maior risco de sofrer eventos isquémicos recorrentes relativamente aos pacientes sensíveis à aspirina [81]. Contudo foram detectados alguns estudos que refutam esta ideia. Foram seguidos, durante 56 meses, 129 pacientes consecutivos com AVC e AIT e avaliou-se a correlação entre a resistência à aspirina e os novos eventos trombóticos, nestes pacientes. Novos eventos trombóticos ocorreram em 19 pacientes (14,7 %), quatro com resistência à aspirina (15,4 %) e 15 sem resistência à aspirina (14.6%). Este estudo concluiu que a resistência à aspirina determinada pela técnica PFA-100 não prevê novos eventos trombóticos nestes pacientes [82]. Outro estudo acompanhou durante dois anos e meio, um grupo de 97 pacientes com doença arterial coronária, que estavam a tomar 160 mg/dia durante um mês ou mais de aspirina. O aumento da resistência à aspirina não foi associado com eventos adversos futuros, entre os quais, a morte, o enfarte agudo do miocárdio ou um evento vascular isquémico [83].

Muitos destes estudos são demasiado pequenos para tirar conclusões significativas e por isso são necessários grandes estudos prospectivos para determinar se a técnica PFA-100 é útil para

predizer eventos adversos, para determinar decisões terapêuticas sobre a terapia com aspirina ou para elaboração de recomendações clínicas.

6. Conclusão

A realização deste trabalho, permitiu estudar os principais métodos laboratoriais usados para estudo da antiagregação plaquetar e, conseqüentemente rever alguns aspectos essenciais da hemostase primária e dos antiagregantes plaquetares, pedra angular do tratamento da doença cardiovascular, causa de elevada mortalidade e morbidade em todo o mundo. Foi proposto, nesta dissertação, dar a conhecer um novo método de estudo in-vitro da hemostase primária, a técnica PFA-100 e alertar para o seu possível uso no estudo da antiagregação plaquetar. Com este trabalho, pretende-se, também, transmitir a importância do estudo laboratorial dos efeitos de diversos antiagregantes plaquetares, pois a resistência a estes fármacos tem se tornado uma realidade crescente e preocupante, em pacientes com doença cardiovascular.

Deste trabalho resulta a verificação que a técnica PFA-100 é um teste simples, rápido e que não requer formação especializada por parte dos profissionais de saúde. Esta técnica, relativamente recente, mostrou-se útil como ferramenta de rastreio para a avaliação e diagnóstico de diversas entidades clínicas relacionadas com a hemostase primária. Para além disso, pode fornecer dados para o estudo dos fármacos antiagregantes plaquetares, entre os quais os inibidores da glicoproteína IIb/IIIa, a aspirina e as tienopiridinas.

Conclui-se que a técnica PFA-100 é útil na monitorização do tratamento com os inibidores da glicoproteína IIb/IIIa, mostrando diferenças na fase de recuperação dos diferentes agentes. Relativamente as tienopiridinas, vários estudos evidenciaram o uso limitado da técnica PFA-100 na sua monitorização. Em contraste, alguns estudos mostraram a utilidade do teste para estudo de um subconjunto de pacientes com AVC, tratados com clopidogrel e para prever resultados adversos em doentes, após intervenção percutânea nos membros inferiores. Verificou-se um sinergismo nos efeitos antiagregantes plaquetares do ácido acetilsalicílico e do clopidogrel, quando usados em conjunto. O teste tem sido, igualmente, amplamente usado para detectar resistências ao ácido acetilsalicílico e correlacionar este facto com futuros eventos adversos nos doentes.

A técnica PFA-100 torna-se um método promissor na avaliação da antiagregação plaquetar mas ainda são necessários mais estudos para permitir concluir a sua utilidade em prever eventos adversos, para determinar decisões terapêuticas sobre a terapia ou para elaboração de recomendações clínicas.

Assim, torna-se pertinente a realização de futuras investigações em temáticas de possível interesse prático e académico. Segue-se a seguinte proposta:

- a) Realizar um estudo em doentes coronários do Centro Hospitalar da Cova da Beira sob antiagregação plaquetar (aspirina, tienopiridinas e tirofiban) que tivessem realizado intervenção percutânea. Este estudo consistiria em retirar uma amostra de sangue destes pacientes e estudar, através da técnica PFA-100, o estado de antiagregação plaquetar no momento da angioplastia, 1 ano, 2 anos e 3 anos após o SCA. Este estudo prospectivo teria como objectivo estudar os efeitos da terapia antiagregante plaquetar na hemostase primária destes pacientes e relacionar estes efeitos com eventuais eventos adversos.

O presente estudo espera, com os resultados apresentados, ter contribuído para a reflexão sobre a importância do estudo laboratorial da antiagregação plaquetar, inclusive com a técnica PFA-100.

7. Bibliografia

1. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006;99:1293-1304.
2. Wasserman EJ, Shipley NM. Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. *Mt Sinai J Med.* 2006;73:431-439.
3. Storey RF. The P2Y₁₂ receptor as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Platelets.* 2001;12:197-209.
4. Fintel Dan J. Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: overview of current and emerging treatment options. *Vascular Health and Risk management.* 2012;8:77-89.
5. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345:494-502.
6. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebocontrolled trial. *Lancet.* 2005;366:1607-1621.
7. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet.* 2001; 358:527-533.
8. Cattaneo M. Aspirin and Clopidogrel: Efficacy, Safety, and Issue of Drug Resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1980-1987.
9. Harrison P. Platelet Function testing. Updated 2012.
10. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 2002;90(10C):40L-48L.
11. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:403-412.
12. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic Principles of platelet Biology and Clinical implications. *Circ J.* 2010;74:597-607.
13. Ueno M, Kodali M, Antonio TM, Angiolillo DJ. Role of platelets and Antiplatelet Therapy in Cardiovascular Disease. *J. Atheroscler thromb.* 2011;18:431-422.
14. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1800-1814.
15. Buchanan GL, Basavarajaiah S, Chieffo A. Stent Thrombosis: Incidence, Predictors and New Technologies. *Thrombosis.* 2012;2012:956962.

16. Lorgis L, Richard C, Zeller M. Les anti-agrégants plaquettaires au cours du syndrome coronarien aigu. Données des grandes études. *Annales de Cardiologie e d'Angéiologie*. 2010; 59:S47-S55.
17. White Harvey D. Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: Current evidence and new directions. *Am Heart J*. 2011;161:450-61.
18. Lewis HD Jr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE III, Schnaper HW, LeWinter MM, Linares E, Pouget JM, Sabharwal SC, Chesler E, DeMots H. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med*. 1983;309:396-403.
19. Schwartz L, Bourassa MG, Lespe´rance J, Aldridge HE, Kazim F, Salvatori VA, Henderson M, Bonan R, David PR. Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1988;318:1714-1719.
20. Antithrombotic Trialists' Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009;373:1849-1860.
21. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86.
22. Harbison, JW. Ticlopidine Versus Aspirin for the Prevention of Recurrent Stroke Analysis of Patients With Minor Stroke From the Ticlopidine Aspirin Stroke Study. *Stroke*. 1992;23:1723-1727.
23. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH; CLASSICS Investigators. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation*. 2000;102(6):624-9.
24. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet*. 1996;348:1329-1339.
25. Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, Weerakkody G, Farid NA, Small DS, et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: Magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J*. 2007;153:66.e9-e16.
26. Jakubowski JA, Payne CD, Brandt JT, Weerakkody GJ, Farid NA, Small DS, et al. The platelet inhibitory effects and pharmacokinetics of prasugrel after administration of loading and maintenance doses in healthy subjects. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47:377 - 384.
27. Wiviott SD, Braunwald E, Angiolillo DJ, Meisel S, Dalby AJ, Verheugt FW, Goodman SG, Corbalan R, Purdy DA, Murphy SA, McCabe CH, Antman EM; TRITON-TIMI 38 Investigators. Greater clinical benefit of more intensive oral antiplatelet therapy with prasugrel in patients with diabetes mellitus in the trial to assess improvement in therapeutic outcomes by

optimizing platelet inhibition with prasugrel-Thrombolysis in Myocardial Infarction 38. *Circulation*. 2008;118:1626-36.

28. Montalescot G, Wiviott SD, Braunwald E, Murphy SA, Gibson CM, McCabe CH, Antman EM; TRITON-TIMI 38 investigators. Prasugrel compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction (TRITON-TIMI 38): double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2009;373:723-31.

29. Capodanno D, Dharmashankar K, Angiolillo DJ. Mechanism of action and clinical development of ticagrelor, a novel platelet ADP P2Y₁₂ receptor antagonist. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8:151-8.

30. Storey RF, Husted S, Harrington RA, Heptinstall S, Wilcox RG, Peters G, Wickens M, Emanuelsson H, Gurbel P, Grande P, Cannon CP. Inhibition of platelet aggregation by AZD6140, a reversible oral P2Y₁₂ receptor antagonist, compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1852-6.

31. Cannon CP, Husted S, Harrington RA, Scirica BM, Emanuelsson H, Peters G, Storey RF; DISPERSE-2 Investigators. Safety, tolerability, and initial efficacy of AZD6140, the first reversible oral adenosine diphosphate receptor antagonist, compared with clopidogrel, in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: primary results of the DISPERSE-2 trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1844-51.

32. Moser M, Bode C. Antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: How can we improve the outcomes? *J Trom Thrombolyses*. 2010;30:240-249.

33. Feher G, Feher A, Pusch G, Koltai K, Tibold A, Gasztonyi B, Papp E, Szapary L, Kesmarky G, Toth K. Clinical importance of aspirin and clopidogrel resistance. *World J Cardiol*. 2010;2(7):171-86.

34. Ueno M, Rao SV, Angiolillo DJ. Elinogrel: pharmacological principles, preclinical and early phase clinical testing. *Future Cardiol*. 2010;6:445-53.

35. Ueno M, Ferreira JL, Angiolillo DJ. Update on the clinical development of cangrelor. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8:1069-77.

36. Kleiman NS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Am Heart J*. 1999;138:263-75.

37. Escolar G, Pino M, Diaz-Ricard M. Diagnóstico de las alteraciones del funcionalismo plaquetario. Servicio de Hemoterapia y Hemostasia, CDB Hospital Clínic de Barcelona.

38. Mascelli MA, Worley S, Veriabo NJ, et al. Rapid assessment of platelet function with a modified whole-blood aggregometer in percutaneous transluminal coronary angioplasty patients receiving anti-GP IIb/IIIa therapy. *Circulation*. 1997;96:3860.

39. Thompson NT, Scrutton MC, Wallis RB. Particle volume changes associated with light transmittance changes in the platelet aggregometer: dependence upon aggregating agent and effectiveness of stimulus. *Thromb Res*. 1986;41:615.

40. Swallow RA, Agarwala RA, Dawkins KD, Curzen NP. Thromboelastography: potential bedside tool to assess the effects of antiplatelet therapy? *Platelets*. 2006;17(6):385-92.
41. Jeffrey W. Smith, PhD; Steven R. Steinhubl, MD; A. Michael Lincoff, MD; Jacqueline C. Coleman, PhD; Theodore T. Lee, PhD; Robert S. Hillman, PhD; Barry S. Collier, MD. Rapid Platelet-Function Assay An Automated and Quantitative Cartridge-Based Method. *Circulation*. 1999;99:620-625.
42. Lin SY, Cui HB, Chen XM, Wang SH, Zhou HL, DU WP, Ye HH, Pan WM, Yang R, Feng MJ, Hu YW, Wang Y, Wang SQ. Clinical application of VerifyNow-P2Y12 assay in evaluation of platelet inhibition efficacy of clopidogrel. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2012;40(8):662-6.
43. Codner P, Vaduganathan M, Rechavia E, Iakobishvili Z, Greenberg G, Assali A, Hasdai D, Battler A, Kornowski R, Lev EI. Clopidogrel response up to six months after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2012;110(3):321-5.
44. Jeong YH, Bliden KP, Antonino MJ, Park KS, Tantry US, Gurbel PA. Usefulness of the VerifyNow P2Y12 assay to evaluate the antiplatelet effects of ticagrelor and clopidogrel therapies. *Am Heart J*. 2012;164(1):35-42.
45. Gurbel PA, Erlinge D, Ohman EM, Neely B, Neely M, Goodman SG, Huber K, Chan MY, Cornel JH, Brown E, Zhou C, Jakubowski JA, White HD, Fox KA, Prabhakaran D, Armstrong PW, Tantry US, Roe MT; TRILOGY ACS Platelet Function Substudy Investigators. Platelet function during extended prasugrel and clopidogrel therapy for patients with ACS treated without revascularization: the TRILOGY ACS platelet function substudy. *JAMA*. 2012;308(17):1785-94.
46. Ozben S, Ozben B, Tanrikulu AM, Ozer F, Ozben T. Aspirin resistance in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol*. 2011;258(11):1979-86.
47. Chu JW, Wong CK, Chambers J, Wout JV, Herbison P, Tang EW. Aspirin resistance determined from a bed-side test in patients suspected to have acute coronary syndrome portends a worse 6 months outcome. *QJM*. 2010;103(6):405-12.
48. Rajendran S, Parikh D, Shugman I, French JK, Juergens CP. High on treatment platelet reactivity and stent thrombosis. *Heart Lung Circ*. 2011;20(8):525-31.
49. Favaloro E.J. Utility of the PFA-100® for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia*. 2001;170:179.
50. Bock M, De Haan J, Beck KH et al. Standardization of the PFA-100® platelet function test in 105 mmol/L buffered citrate: effect of gender, smoking, and oral contraceptives. *Br J Haematol*. 1999;106:898-904.
51. Sestito A, Sciahbasi A, Landol® R, Maseri A, Lanza GA, Andreotti F. A simple assay for platelet-mediated hemostasis in flowing whole blood (PFA-100): reproducibility and effects of sex and age. *Cardiologia*. 1999;44:661-5.
52. Rand ML, Carcao MD, Blanchette VS. Use of the PFA-100 in the assessment of primary, platelet-related hemostasis in a pediatric setting. *Semin Thromb Hemost*. 1998;24:523-9.

53. Jilma-Stohlawetz P, Hergovich N, Homoncik M, et al. Impaired platelet function among platelet donors. *Thromb Haemost.* 2001;86:880-886.
54. Hayward C.P.M et al. Platelet function analyser (PFA)-100 ® closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2006;4(2):312-9.
55. von Pape K, Aland E, Bohner J. Platelet function analysis with PFA-100® in patients medicated with acetylsalicylic acid strongly depends on concentration of sodium citrate used for anticoagulation of blood sample. *Thromb Res.* 2000;98:295-9.
56. Kottke-Marchant K, Powers JB, Brooks L, Kundu S, Christie DJ. The effect of antiplatelet drugs, heparin, and preanalytical variables on platelet function detected by the platelet function analyzer (PFA-100). *Clin Appl Thromb Hemost.* 1999;5:122-30.
57. Escolar G, Cases A, Vinas M, Pino M, Calls J, Cirera I, Ordinas A. Evaluation of acquired platelet dysfunctions in uremic and cirrhotic patients using the platelet function analyzer (PFA-100): influence of hematocrit elevation. *Haematologica.* 1999;84:614-9.
58. Chakroun T. et al. Aspirin Resistance and von Willebrand Factor. *British Journal of Haematology.* 2004;124:80-85.
59. MadanM, Berkowitz SD, Christie DJ, Smit AC, Sigmon KN, Tchong JE. Determination of platelet aggregation inhibition during percutaneous coronary intervention with the platelet function analyzer PFA-100. *Am Heart J.* 2002;144:151-8.
60. MadanM, Berkowitz SD, ChristieDJ, Jennings LK, SmitAC, Sigmon KN, Glazer S, Tchong JE. Rapid assessment of glycoprotein IIb/IIIa blockade with the platelet function analyzer (PFA - 100) during percutaneous coronary intervention. *Am Heart J.* 2001;141:226-33.
61. Hezard N, Metz D, Nazeyrollas P, Droulle C, Elaerts J, Potron G, Nguyen P. Use of the PFA-100 apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of c7E3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. *Thromb Haemost.* 2000;83:540-4.
62. Mueller T, Haltmayer M, Poelz W, Haidinger D. Monitoring aspirin 100 mg and clopidogrel 75 mg therapy with the PFA-100 device in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Endovascular Surg.* 2003;37:117-23.
63. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, WalterU, Schinzel R. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clin Chem.* 2005;51:957-65.
64. Dyszkiewicz-Korpanty et al. Clopidogrel anti-platelet effect: An evaluation by optical aggregometry, impedance aggregometry, and the Platelet Function Analyser (PFA-100™). *Platelets.* 2007;18(7):491-496.
65. Madsen E. H. et al. Effects of aspirin and clopidogrel in healthy men measured by platelet aggregation and PFA-100. *Platelets.* 2008;19(5):335-341.
66. Mueller T, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Utility of the PFA-100 instrument and the novel multiplate analyzer for the assessment of aspirin and clopidogrel effects on platelet function in patients with cardiovascular disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009;15(6):652-9.

67. Grau AJ, Reiners S, Lichy C, Buggle F, Ruf A. Platelet function under aspirin, clopidogrel, and both after ischemic stroke: a case-crossover study. *Stroke*. 2003;34:849-54.
68. Ziegler S, Maca T, Alt E, Speiser W, Schneider B, Minar E. Monitoring of antiplatelet therapy with the PFA-100 in peripheral angioplasty patients. *Platelets*. 2002;13:493-7.
69. Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, et al. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost*. 2000;83:316.
70. Marshall PW, Williams AJ, Dixon RM, Growcott JW, Warburton S, Armstrong J, Moores J. A comparison of the effects of aspirin on bleeding time measured using the Simplate method and closure time measured using the PFA-100, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 1997;44(2):151-5.
71. Alberts MJ, Bergman DL, Molner E, Jovanovic BD, Ushiwata I, Teruya J. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease. *Stroke*. 2004;35(1):175-8.
72. Aydinalp A, Atar I, Altin C, Gülmez O, Atar A, Açikel S, Bozbaş H, Yildirim A, Müderrisoğlu H. Platelet function analysis with two different doses of aspirin. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2010;38(4):239-43.
73. Roller RE, Dorr A, Ulrich S, Pilger E. Effect of aspirin treatment in patients with peripheral arterial disease monitored with the platelet function analyzer PFA-100. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13(4):277-81.
74. Ronan A Cahill, AFRCSEd, Gerard T McGreal, FRCS, Basil H Crowe, FIMLS, Damien A Ryan, AFRCSEd, Brian J Manning, MB, AFRCSEd, Mary R Cahill, MD, H Paul Redmond, MCh, FRCS. Duration of Increased Bleeding Tendency after Cessation of Aspirin Therapy. *J Am Coll Surg*. 2005;200:564-573.
75. Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I. Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res*. 2002;108:37-42.
76. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2001;88:230-5.
77. Addad F, Hassine M, Ben Farhat M, Abderrazak F, Chakroun T, Gamra H, Hamdi S, Betbout F, Samama M, Elalamy I. Intra-individual variability of the platelet anti-aggregation effect of aspirin in coronary patients. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005;98(10):979-83.
78. Linnemann B, Prochnow S, Mani H, Schwonberg J, Lindhoff-Last E. Variability of non-response to aspirin in patients with peripheral arterial occlusive disease during long-term follow-up. *Ann Hematol*. 2009;88(10):979-88.
79. Mortensen J. et al. Monitoring aspirin therapy with the Platelet Function Analyser-100. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(8):786-92.
80. Chiu FC, Wang TD, Lee JK, Shih FY, Lin JW, Huang CH, Chen WJ, Chen. Residual platelet reactivity after aspirin and clopidogrel treatment predicts 2-year major cardiovascular events

in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur J Intern Med.* 2011;22(5):471-7.

81. Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008;6(3):444-50.

82. Boncoraglio GB, Bodini A, Brambilla C, Corsini E, Carriero MR, Parati EA. Aspirin resistance determined with PFA-100 does not predict new thrombotic events in patients with stable ischemic cerebrovascular disease. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009;111(3):270-3.

83. Christiaens L, Ragot S, Mergy J, Allal J, Macchi L. Major clinical vascular events and aspirin-resistance status as determined by the PFA-100 method among patients with stable coronary artery disease: a prospective study. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008;19(3):235-9.

