

**Marianna Deway Andrade**

**Alta atividade plaquetária residual em resposta ao ácido  
acetilsalicílico em pacientes com síndrome isquêmica  
miocárdica instável sem supradesnível de ST:  
comparação entre as fases aguda e tardia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências.

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Nicolau

São Paulo

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Marianna Deway

Alta atividade plaquetária residual em resposta ao ácido acetilsalicílico em pacientes com síndrome isquêmica miocárdica instável sem supradesnível de ST : comparação entre as fases aguda e tardia / Marianna Deway Andrade. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.

Orientador: José Carlos Nicolau.

Descritores: 1. Síndrome coronariana aguda 2. Resistência a medicamentos  
3. Agregação plaquetária 4. Aspirina/administração & dosagem 5. Isquemia  
miocárdica

USP/FM/DBD-146/13

**Dedicatória**

---

À minha linda família, meu porto seguro, de onde venho e para onde sempre volto para reabastecer antes de qualquer viagem.

Ao meu pai Jadelson, exemplo de tudo na minha vida.

À minha mãe Tânia, sinônimo de amor incondicional.

Ao meu irmão José Mendes, meu grande conselheiro.

Ao meu marido Samir, parceiro de todas as horas, incentivador de todos os meus sonhos.

À minha princesa Giovanna, fruto e fonte da minha felicidade.

À minha avó Edna, dona de toda a sabedoria.

À minha cunhada Cássia e a minha afilhada Maria Clara que embelezam a nossa família.

Aos meus sogros Sônia e Parascos, aos meus cunhados, à minha madrinha Rita, aos meus tios e primos.

Ao Hospital da Bahia, local que escolhi e que me escolheu para continuar exercendo a minha melhor medicina.

## **Agradecimientos**

---

Ao Professor Dr. José Carlos Nicolau, pela orientação meticulosa e impecável, pelo caráter exemplar e pela incontestável disponibilidade. Acima de tudo, sinto-me honrada em tê-lo como meu Orientador.

Ao Professor Dr. Roberto Kalil Filho, pela oportunidade do convívio diário ao longo de muitos anos e por ter sido um verdadeiro mestre e guia da minha carreira médica.

A todos os amigos da Unidade Clínica de Coronariopatia Aguda, pela parceria.

Ao Dr. Élbio D'Amico, Dra. Tânia Rocha e toda a equipe do laboratório de coagulação do HC-FMUSP, pela disponibilização do espaço e apoio em todo o processo.

Às biomédicas Amanda Lettieri e Susana Baradel, fundamentais para a execução do projeto, agradeço pela dedicação e competência.

Ao Dr. Herlon Saraiva Martins, por todo o incentivo e orientação.

Ao Dr. Alexandre da Costa Pereira, pelo auxílio na análise genética, e a toda sua equipe do laboratório da genética pela disponibilização do serviço e ajuda inestimável.

Ao Professor Dr. Pedro Lemos, pelas dicas valiosas e pelas análises dos escores angiográficos.

À estatística Creusa Maria Roveri Dal Bó, pela competência e disponibilidade em horas difíceis.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Palandre Chagas, por ter me dado a primeira oportunidade de frequentar o Instituto do Coração quando ainda era uma estudante de Medicina.

Ao Instituto do Coração, por representar a fonte do meu conhecimento e o templo de todas as minhas oportunidades como médica e pesquisadora.

Aos pacientes, pelo altruísmo. Sem a participação de vocês nada disso seria possível.



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota d’água na  
imensidão do mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

**Normatização adotada**

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

## **Sumário**

---

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****SUMMARY**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1	História do ácido acetilsalicílico.....	02
1.2	Importância clínica do uso do AAS.....	02
1.3	Farmacodinâmica do AAS.....	04
1.4	Farmacocinética do AAS.....	06
1.5	Definição e prevalência de alta atividade plaquetária residual (AAPR) em uso do AAS.....	07
1.6	Prognóstico relacionado à AAPR em uso do AAS.....	10
1.7	Mecanismos potenciais para AAPR em uso do AAS.....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>15</b>
2.1	Objetivo primário.....	16
2.2	Objetivos secundários.....	16
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1	Desenho.....	19
3.2	Casuística.....	19
3.3	Métodos.....	19
3.3.1	Critérios de inclusão.....	19
3.3.2	Critérios de exclusão.....	20
3.3.3	Entrevistas médicas.....	20
3.4	Dosagens Laboratoriais.....	22
3.4.1	Coleta de sangue.....	22
3.4.2	Dosagens laboratoriais.....	23
3.4.3	Testes de avaliação da atividade inflamatória.....	25
3.4.4	Determinação genética do pilimorfismos do receptor da GPIIb/IIIa.....	25
3.4.5	Análises dos polimorfismos genéticos.....	27
3.4.6	Definições de Alta Atividade Plaquetária Residual em uso de AAS de acordo com os testes plaquetários.....	28

---

3.4.7	Análises estatísticas.....	28
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	Características basais da população.....	31
4.2	Objetivo primário: Comparação dos testes plaquetários entre as fases aguda e tardia.....	35
4.3	Relação entre o desfecho composto de óbito, IAM, angina instável e necessidade de revascularização e de internação, aos três meses de evolução, com níveis de agregação plaquetária.....	43
4.4	Correlação entre os diferentes testes plaquetários utilizados: TXB <sub>2</sub> , PFA, VFN e AST com AA e AST com Colágeno.....	45
4.5	Relação entre a carga aterosclerótica pela cineangiocoronariografia e os testes plaquetários.....	46
4.6	Relação entre PCR e IL-6 com os testes plaquetários.....	48
4.7	Análises de subgrupos.....	50
4.8	Avaliação da relação entre os testes plaquetários e presença ou não de polimorfismo do receptor plaquetário da glicoproteína IIb/IIIa.....	52
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
5.1	Comparação dos testes plaquetários entre as fases aguda e tardia.....	58
5.2	Carga aterosclerótica.....	59
5.3	Marcadores inflamatórios.....	60
5.4	Polimorfismo do receptor plaquetário da glicoproteína IIb/IIIa.	62
5.5	Correlação entre os diferentes testes plaquetários utilizados	63
5.6	Análises de subgrupos pré-especificados.....	65
5.7	Relação entre desfechos clínicos aos três meses de evolução, com níveis de agregação plaquetária.....	66
<b>6</b>	<b>LIMITAÇÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

**Listas**

---

<b>AAS</b>	Ácido Acetilsalicílico
<b>AA</b>	Ácido Aracdônico
<b>AO</b>	Agregometria Óptica
<b>AAPR</b>	Alta Atividade Plaquetária Residual
<b>AST</b>	Agregometria de Sangue Total
<b>ATC</b>	Angioplastia Transluminal Coronária
<b>AVC:</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BRA</b>	Bloqueadores do Receptor de Angiotensina
<b>CK-MB</b>	Fração MB da creatinofosfoquinase
<b>COX-1</b>	Cicloxigenase-1
<b>COX-2</b>	Cicloxigenase-2
<b>CRM</b>	Cirurgia de Revascularização Miocárdica
<b>DAC</b>	Doença Arterial Coronária
<b>DM</b>	Diabetes Melito
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>FEVE</b>	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
<b>HDL</b>	Lipoproteína de Alta Densidade
<b>IAM</b>	Infarto Agudo do Miocárdio
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IECA</b>	Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina
<b>ISIS-2</b>	<i>International Study of Infarct Survival</i>
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baixa Densidade
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i>



<b>PCR</b>	Proteína C Reativa
<b>PFA</b>	<i>Platelet Function Analyzer</i>
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>P25</b>	Percentil 25
<b>P75</b>	Percentil 75
<b>RR</b>	Risco Relativo
<b>SIMI</b>	Síndromes Miocárdicas Isquêmicas Instáveis
<b>TF</b>	Tempo de Fechamento
<b>TG</b>	Triglicérides
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxane A <sub>2</sub>
<b>TXB<sub>2</sub></b>	Tromboxane B <sub>2</sub>
<b>URA</b>	Unidades de Reação ao AAS
<b>USIC</b>	Ultrassom Intracoronário
<b>VFN</b>	<i>VerifyNow</i>

<b>FIGURA 1.</b>	Ação antiplaquetária do AAS.....	05
<b>FIGURA 2.</b>	Classificação dos Testes Plaquetários.....	08
<b>FIGURA 3.</b>	Resultados do PFA: comparação entre as fases aguda e tardia.....	36
<b>FIGURA 4.</b>	Resultados do AST com AA: comparação entre as fases aguda e tardia.....	37
<b>FIGURA 5.</b>	Resultados do VFN: comparação entre as fases aguda e tardia.....	37
<b>FIGURA 6.</b>	Prevalência de AAPR: comparação entre as fases aguda e tardia.....	39
<b>FIGURA 7.</b>	Correlação entre a variação da PCR e do VFN (fase tardia – fase aguda.....	50

---

<b>Tabela 1.</b>	Características basais dos pacientes na admissão.....	33
<b>Tabela 2.</b>	Resultados dos exames laboratoriais realizados na admissão.....	34
<b>Tabela 3.</b>	Testes plaquetários: comparação entre as fases aguda e tardia.....	36
<b>Tabela 4.</b>	Prevalência de AAPR: comparação entre as fases aguda e tardia.....	38
<b>Tabela 5.</b>	Distribuição dos pacientes nos quatro grupos de acordo com o AST com AA e VFN.....	40
<b>Tabela 6.</b>	Características basais dos pacientes de acordo com os grupos pelo AST com AA.....	41
<b>Tabela 7.</b>	Características basais dos pacientes de acordo com os grupos pelo VFN.....	42
<b>Tabela 8.</b>	Comparação entre os resultados dos testes plaquetários da fase aguda em relação à incidência de eventos (IAM, angina, óbito, reinternação e revascularização) em três meses.....	43
<b>Tabela 9.</b>	Comparação da incidência de eventos entre os grupos de acordo com o AST com AA e VFN.....	44
<b>Tabela 10.</b>	Correlação dos testes plaquetários na fase aguda.....	45
<b>Tabela 11.</b>	Correlação dos testes plaquetários na fase tardia.....	45
<b>Tabela 12.</b>	Correlação entre os escores angiográficos de extensão e de estenose e os resultados da fase aguda dos testes plaquetários.....	46
<b>Tabela 13.</b>	Distribuição dos pacientes de acordo com o escore angiográfico de vasos.....	47
<b>Tabela 14.</b>	Relação entre o escore angiográfico de vasos e os resultados de fase aguda dos testes plaquetários.....	48
<b>Tabela 15.</b>	Comparação dos marcadores inflamatórios (PCR e IL-6) na fase aguda <i>versus</i> a fase tardia.....	49
<b>Tabela 16.</b>	Correlação entre a variação dos marcadores inflamatórios e dos testes plaquetários (fase tardia – fase aguda).....	49
<b>Tabela 17.</b>	Análise de subgrupos em relação ao objetivo primário.....	51

<b>Tabela 18.</b>	Características basais dos pacientes na admissão de acordo com o grupo enotípico.....	53
<b>Tabela 19</b>	Testes plaquetários: comparação entre as fases aguda e tardia de acordo com o grupo genotípico.....	54
<b>Tabela 20</b>	Teste estatístico do efeito tempo, genótipo e interação tempo e genótipo.....	55

**Resumo**

---

Andrade, MD. *Alta Atividade Plaquetária Residual em Resposta ao Ácido Acetilsalicílico em pacientes com Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável sem Supradesnível de ST: Comparação entre as Fases Aguda e Tardia* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

**INTRODUÇÃO:** Racional: A alta atividade plaquetária residual (AAPR) em uso do AAS é considerada um fator de mau prognóstico em portadores de síndrome isquêmica miocárdica instável (SIMI). Adicionalmente, as taxas de prevalência de AAPR verificadas em diferentes estudos realizados na fase aguda das SIMI são consideradas elevadas em relação às verificadas em portadores de doença arterial coronariana estável. Todavia, não está bem demonstrado se essa elevada prevalência de AAPR diagnosticada na fase aguda das SIMI representa um fenômeno transitório, desaparecendo na fase tardia, ou se é um estado permanente, independente da fase aguda.

**MÉTODOS:** O objetivo primário do presente estudo foi o de comparar, em pacientes com SIMI sem supradesnível do segmento ST, a resposta antiplaquetária ao AAS nas fases aguda e tardia na mesma população. Foram incluídos 70 pacientes com SIMI sem supradesnível de ST (77% com angina instável e 22% com IAM sem supra de ST), com idade média de 64,97 anos, sendo 54% do sexo feminino, todos em uso de AAS na dose de 100 a 200mg por pelo menos sete dias anteriores à inclusão. Os pacientes foram submetidos a cinco testes de agregação plaquetária na fase aguda, e os mesmos testes foram repetidos na fase tardia, três meses depois: *VerifyNowAspirin*®, agregometria de sangue total (AST) com ácido aracdônico (AA) e colágeno, tromboxane B2 sérico, PFA-100. **RESULTADOS:** De acordo com os testes COX-1 específicos (VFN e AST com AA), a AAPR em uso do AAS foi mais prevalente na fase aguda das SIMI do que na fase tardia (VFN: 32,1% versus 16%,  $p=0,049$ ; e AST com AA: 31,4% versus 12,8%,  $p=0,015$ ). Os testes não específicos (AST com colágeno, PFA) e o teste bioquímico não conseguiram demonstrar diferenças entre as fases. A correlação entre os cinco testes realizados foi considerada fraca ou moderada. **CONCLUSÃO:** A alta prevalência de AAPR, apesar do uso da AAS durante as SIMI, reflete mais provavelmente um estado de hiper-reatividade plaquetária transitória, que se reverte na fase crônica e estável da DAC, de acordo com os testes COX-1 específicos. A correlação entre os testes plaquetários foi apenas moderada nos dois cenários.

**Descritores:** 1. Síndrome coronariana aguda 2. Resistência a medicamentos 3. Agregação plaquetária 4. Aspirina/administração & dosagem 5. Isquemia miocárdica.

## **Summary**

---

Andrade MD. High Residual Platelet Activity in response to aspirin in patients with non ST acute coronary syndromes: comparison between the acute and late phases [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

**BACKGROUND:** The high residual platelet activity (HRPA) in response to acetylsalicylic acid (ASA) is considered a poor prognostic factor in patients with acute coronary syndromes (ACS). Additionally, the HRPA prevalence rates reported by different studies in ACS patients are considered high compared to those reported in patients with stable coronary artery disease. However, it is not well demonstrated whether this high HRPA prevalence diagnosed during the acute phase represents a transient phenomenon, disappearing in the late phase, or if it is a permanent state, independent of the acute phase.

The aim of this study was to compare platelet aggregation in response to ASA during the ACS acute phase with the platelet aggregation in chronic stable phase. **METHODS:** Inclusion of patients with non ST ACS who were on aspirin at a dose of 100mg to 200mg per day for at least seven days prior to inclusion. We conducted five tests of platelet aggregation in the first 48 hours and repeated them three months later: VerifyNow Aspirin® (VFN), Whole Blood aggregometry (WBA) with arachidonic acid (AA) and collagen, thromboxane B2, PFA-100®. We analyzed 70 patients (77% with unstable angina and 22% with non ST AMI), mean age 64.97 years, 54% female. According to the COX-1 specific tests, the HRPA was more frequent in the acute phase than in the chronic phase (VerifyNowAspirin®: 31.4% versus 12.8%,  $p=0.015$ ; and WBA with AA: 32.1% versus 16%,  $p=0.049$ ; respectively). The non specific tests (AST with collagen and PFA) and the biochemical test sTXB2 failed to show differences between the phases. The correlation between the five tests was considered weak or moderate. **CONCLUSION:** The high prevalence of RPA despite the use of aspirin during the acute phase of the SCA most likely reflects a state of transient platelet hyperreactivity, which is reversed in the chronic phase. The correlation between platelet tests was only moderate in both scenarios.



**DESCRIPTORS:** 1. Acute coronary Syndrome 2. Drug resistance 3. Platelet aggregation 4. Aspirin 5. Myocardial ischemia.

# **1. Introdução**

---

## 1.1 História do ácido acetilsalicílico

Admite-se que a primeira descrição científica do ácido acetilsalicílico (AAS) tenha ocorrido em 1763, quando o Reverendo Edward Stone publicou os seus achados sobre a descoberta da salicilina a partir da casca do salgueiro e suas propriedades analgésicas(1). Mais de um século depois, em 1897, os laboratórios Bayer passaram a produzir e a comercializar a Aspirina® como analgésico e anti-inflamatório. Todavia, somente a partir da década de 1950 têm início os primeiros relatos sobre o potencial antitrombótico do AAS (2, 3). Desde então, o AAS passou a ser testado em diferentes ensaios clínicos nos cenários das doenças aterotrombóticas, incluindo-se estudos de prevenção primária e secundária, como será visto na sequência.

## 1.2 Importância clínica do uso do AAS

Já na década de 1980 se demonstrava, em pacientes com angina instável, que em curto prazo o uso do AAS levava a uma redução de aproximadamente 50% na incidência de eventos cardiovasculares maiores (angina, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte cardiovascular)(4, 5). Na mesma época, no contexto do infarto agudo do miocárdio (IAM) com supradesnível do segmento ST, o AAS foi testado no estudo ISIS-2 (*International Study of Infarct Survival*), que incluiu 17.187

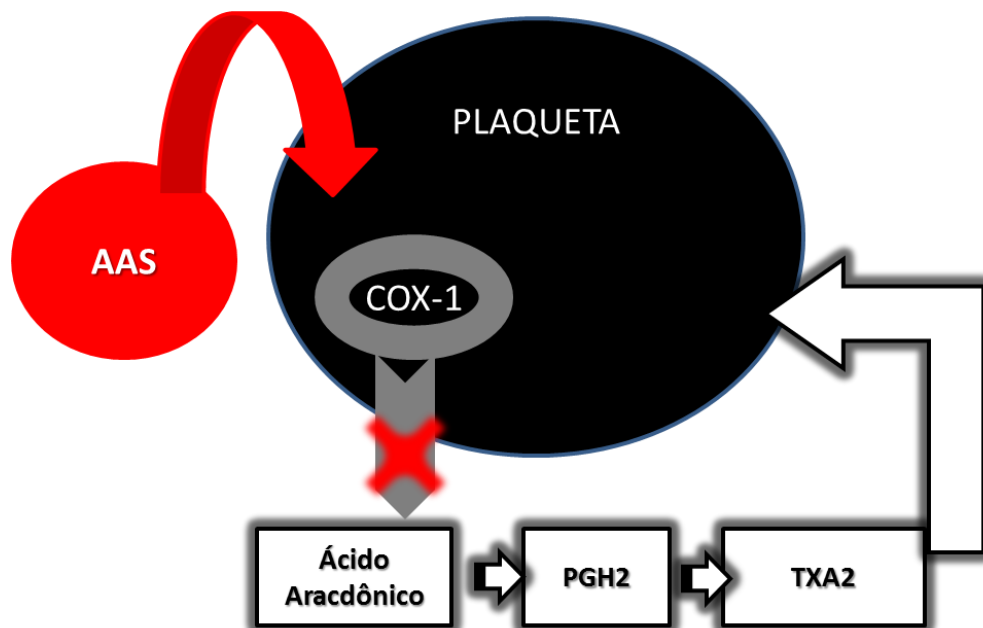
pacientes e demonstrou que o uso isolado do medicamento levava a uma redução de 23% na mortalidade aos 35 dias de evolução, e a associação com a estreptoquinase (trombolítico) aumentava o benefício, chegando a 42% de redução da mortalidade, quando comparado com placebo (6).

Provavelmente a mais importante meta-análise sobre os benefícios relacionados ao uso do AAS na prevenção secundária das doenças aterotrombóticas foi publicada em 2002(7). Nesta publicação, demonstrou-se a redução de 22% no risco relativo do desfecho composto de IAM não fatal, acidente vascular cerebral (AVC) e óbito cardiovascular (13,2% *versus* 10,7%,  $p < 0,0001$ ), a favor do grupo AAS. Em 2009, o mesmo grupo de pesquisadores publicou uma nova meta-análise incluindo 6 estudos de prevenção primária (95.000 pacientes) e 16 estudos de prevenção secundária (17.000 pacientes) comparando o uso crônico de AAS com placebo. Nos estudos de prevenção primária houve redução de 12% ( $p = 0,0001$ ) no risco relativo de eventos cardiovasculares maiores (IAM, AVC e morte cardiovascular), porém com uma redução de risco absoluto de apenas 0,06% ao ano. Já nos estudos de prevenção secundária houve redução de 19% no mesmo desfecho combinado (6,7% *versus* 8,2%,  $p < 0,0001$ ), com redução significativa no risco absoluto de 1,5% ao ano.(8)

Em razão dessas evidências, entre outras, o AAS se constitui em tratamento de primeira escolha nas doenças aterotrombóticas, sendo recomendado pelas diretrizes das principais sociedades de cardiologia para a prevenção secundária e primária, em pacientes de alto risco cardiovascular(9-11). Sendo assim, estima-se que, apenas nos Estados Unidos, aproximadamente 30 milhões de pessoas utilizem AAS de forma rotineira(12).

### 1.3 Farmacodinâmica do AAS

Como representado na Figura 1, a ação do AAS como antiagregante plaquetário ocorre por meio da acetilação irreversível da molécula da serina na posição 529 da enzima da cicloxigenase-1 (COX-1), presente constitutivamente nas plaquetas. A COX-1 possui atividade de prostaglandina sintase, catalisando o primeiro passo da produção dos endoperóxidos cíclicos, ou seja, a conversão do ácido aracdônico em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)(13). No interior das plaquetas a PGH<sub>2</sub> é transformada, por meio da tromboxane sintase, em Tromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), atuando como amplificadora do processo de ativação plaquetária. O TXA<sub>2</sub>, por sua vez, é um potente agonista plaquetário, sendo liberado na circulação, onde exerce efeitos parácrino e autócrino. Ao se ligar aos seus receptores plaquetários específicos, o TXA<sub>2</sub> aumenta a expressão de receptores de fibrinogênio na superfície plaquetária e age de forma sinérgica com os outros agonistas. Além disso, o TXA<sub>2</sub> é reconhecido como potente vasoconstrictor, o que também pode contribuir para a instabilização da placa aterosclerótica.



Legenda: O AAS age sobre a COX-1, bloqueando-a irreversivelmente. A COX-1, por sua vez, atua sobre o ácido aracdônico, produzindo a PGH<sub>2</sub>, precursora direta do TXA<sub>2</sub>, potente agonista plaquetário e vasoconstritor. Ao bloquear a COX-1, o AAS bloqueia todo o processo de ativação plaquetária dependente do TXA<sub>2</sub>.

**Figura 1 -** Ação antiplaquetária do AAS:

Em virtude de as plaquetas serem anucleadas e, portanto, possuírem uma mínima capacidade de síntese proteica, o bloqueio da COX-1 pelo AAS é irreversível durante toda a sobrevivência plaquetária (7 a 10 dias). Adicionalmente, o efeito do AAS sobre a COX-1 é saturado com baixas doses (100mg em dose única ou 20 a 40mg por dia em doses repetidas)(14). No entanto, reconhece-se que outros efeitos antiplaquetários do AAS (não dependentes da COX-1), que serão relatados na sequência, seriam dose-dependente(15).

O AAS também bloqueia a COX-2, isoforma presente em plaquetas recém-formadas, além de monócitos e células endoteliais. Exceto em situações com alta taxa de renovação celular como, por exemplo, nas SIMI, pós-

operatório de cirurgia cardíaca(16), as plaquetas imaturas constituem apenas de 8 a 10% do volume plaquetário circulante(17). Apesar de a ação do AAS nas doses habitualmente utilizadas para o tratamento e prevenção das doenças aterotrombóticas sobre a COX-2 ser 170 vezes menos potente do que sobre a COX-1(18), o real significado do TXA<sub>2</sub> derivado da COX-2 nos cenários clínicos é desconhecido(19).

Finalmente, reconhece-se que o AAS possui efeitos pleiotrópicos sobre o sistema cardiovascular que são independentes da ação sobre a COX-1 ou COX-2. Entre esses efeitos, ressalta-se a ação do AAS como facilitador da inibição plaquetária mediada por neutrófilos, por meio de mecanismos envolvendo óxido nítrico e GMP cíclico(20). Finalmente, estudos experimentais demonstram a ação do AAS como antioxidante, reduzindo a oxidação do LDL-colesterol(21) e melhorando a disfunção endotelial em vasos ateroscleróticos(22), exercendo assim, potencialmente, papel protetor ainda mais abrangente sobre a doença aterosclerótica.

#### **1.4 Farmacocinética do AAS**

O AAS, na sua formulação regular (não recoberta), é absorvido rapidamente no estômago e intestino delgado. A sua biodisponibilidade é cerca de 50% porque uma parte é inativada no metabolismo hepático de “primeira passagem”. O seu metabolismo é predominantemente hepático e intestinal, onde as carboxiestearases transformam o AAS em partes de acetil e salicilato.

O pico plasmático do medicamento ocorre em até 40 minutos após a ingestão. Após 60 minutos da ingestão oral de 100mg de AAS, já é possível detectar um significativo bloqueio da produção do TXA<sub>2</sub>(23). Acredita-se que a formulação entérica tenha um retardo na absorção e biodisponibilidade, sendo questionado por alguns autores se essas alterações farmacocinéticas podem afetar a sua eficácia antiagregante(24). Apesar de a meia-vida plasmática ser de aproximadamente 15 a 20 minutos, o caráter irreversível do bloqueio da COX-1 exercido pelo AAS permite que o seu efeito máximo seja mantido, na maioria dos indivíduos, utilizando-se doses com intervalos de 24 a 48 horas.

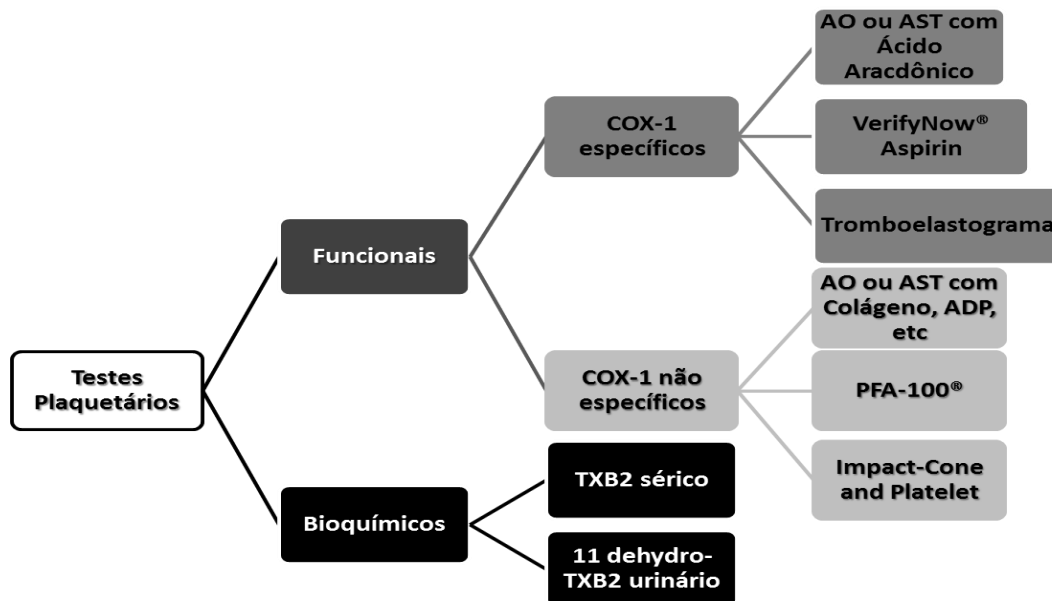
### **1.5 Definição e prevalência da alta atividade plaquetária residual (AAPR) em uso do AAS**

Há muito tempo se reconhece a grande variabilidade intra e interindividual da resposta antiplaquetária ao AAS. No cenário clínico, entre 8 e 18% dos indivíduos desenvolvem novos eventos isquêmicos agudos apesar do uso crônico de AAS(7, 8), podendo esse fenômeno ser chamado de “resistência clínica”. No entanto, sabe-se que os eventos aterotrombóticos envolvem múltiplos fatores agravantes e desencadeantes, e que o bloqueio da função plaquetária, apesar de muito importante, não é o único fator envolvido no processo.

Do ponto de vista laboratorial, ainda não foi padronizado um teste específico e confiável que possa, irrefutavelmente, diagnosticar a resposta plaquetária ao AAS ou a outros antiagregantes. Os testes atualmente utilizados



podem ser classificados em: testes bioquímicos (dosagem de tromboxane B2 sérico e 11-dehydro-tromboxane B2 urinário) e testes funcionais (Figura 2). Os testes bioquímicos avaliam se o AAS bloqueia o seu alvo molecular (a COX-1), e os testes funcionais avaliam em que medida o AAS é capaz de modificar a agregação plaquetária. Os testes funcionais, por sua vez, podem ser divididos em COX-1 específicos, que utilizam o ácido aracdônico como agonista – estes incluem a agregometria óptica (AO), agregometria por impedância ou de sangue total (AST), tromboelastograma e o *VerifyNow® Aspirin* (VFN) – e os testes COX-1 não específicos, que utilizam outros agonistas como o ADP e o colágeno, a exemplo de AO, AST, *Platelet function analyzer* (PFA-100®) e *Impact cone-and-platelet*.



**Legenda:** TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; AO: agregometria óptica; AST: agregometria de sangue total; PFA-100: *platelet function analyzer*

**Figura 2 -** Classificação dos Testes Plaquetários

De acordo com o Grupo de Estudos sobre trombose da Sociedade Europeia de Cardiologia(25) para a avaliação da resposta ao AAS os testes que devem ser empregados são os funcionais COX-1 específicos, e a dosagem sérica do tromboxane B2.

Diversos estudos foram realizados com diferentes testes e em diferentes cenários clínicos, sendo verificadas prevalências de AAPR em uso do AAS variando desde 0 até 83%(26-29). Em revisão sistemática(30) publicada em 2007 incluindo 42 estudos, sendo 34 publicados e 8 resumos apresentados em congressos, a prevalência média de AAPR com o uso do AAS foi de 24%, variando de 0 a 57% (Intervalo de confiança – IC 95% - 20% a 28%). Os estudos que utilizaram a AO com ácido aracdônico como agonista apresentaram menor prevalência em relação aos outros testes (6%, IC 95% 0 a 12% *versus* 26%, IC 95% 21% a 31%). Deve-se ressaltar que os estudos incluídos nessa revisão sistemática, e a maior parte dos estudos publicados até o momento, avaliaram a resposta ao AAS em pacientes com doença aterosclerótica estável. Poucos estudos incluíram pacientes com SIMI, como o de Acikel e cols(31), em que 96 pacientes com angina instável e IAM sem supradesnível do segmento ST em uso prévio de AAS demonstraram prevalência de 29% de AAPR pelo método do PFA-100®. Os pacientes considerados portadores de AAPR em uso do AAS tinham maior prevalência de IAM sem supradesnível do segmento ST, níveis mais elevados de marcadores de necrose miocárdica, e maior pontuação na classificação de risco TIMI, ou seja, eram claramente pacientes de maior risco.

## 1.6 Prognóstico relacionado à AAPR apesar do uso do AAS

A relevância prognóstica dos achados de AAPR em uso do AAS foi avaliada em estudos prospectivos, como o de Chen e cols(32). Nesse estudo foram incluídos 468 pacientes com doença arterial coronária estável avaliados pelo teste *VerifyNow Aspirin®*, e nele os autores encontraram 27,4% dos pacientes com AAPR. Em seguimento médio de  $379 \pm 200$  dias, os pacientes com AAPR apresentaram maior incidência de eventos combinados (óbito cardiovascular, IAM, AVC, angina requerendo hospitalização e ataque isquêmico transitório): 15,6% *versus* 5,3%, risco relativo (RR) de 3,12; IC 95% 1,65 a 5,91;  $p < 0,01$ . Em 2002, Eikelboom e cols(33) publicaram estudo de caso-controle avaliando 976 pacientes incluídos no estudo HOPE (*Heart Outcome Prevention Evaluation*). As dosagens urinárias de 11-dehydro-tromboxane B<sub>2</sub> de 488 pacientes que faziam uso de AAS e apresentaram eventos cardiovasculares maiores foram comparadas com amostras de 488 pacientes em uso de AAS que não apresentaram eventos. O risco do desfecho combinado de IAM, AVC ou óbito cardiovascular aumentou de forma proporcional aos quartis do 11-dehydro-tromboxane B<sub>2</sub> urinário, sendo que os pacientes no quartil superior apresentaram risco significativamente maior do que os pacientes no quartil inferior [*odds ratio* (OR) 1,8; IC 95% 1,2 a 2,7;  $P=0,009$ ]. Da mesma forma, os pacientes do quartil superior tiveram maior risco de IAM (OR 2,0; IC 95% 1,2 a 3,4;  $P=0,006$ ) e morte cardiovascular (OR 3,5; IC 95% 1,7 a 7,4;  $P < 0,001$ ) isoladamente do que os pacientes no quartil inferior.

Ainda, em meta-análise publicada em 2008(34), incluindo 11 estudos prospectivos com seguimentos de seis dias a quatro anos, foi demonstrado que

pacientes com AAPR em uso do AAS apresentavam risco significativamente maior de eventos cardiovasculares (RR 3,11; IC 95% 1,88 a 5,15;  $p < 0,0001$ ). No mesmo ano de 2008, Krasopoulos e cols(35) demonstraram, por meta-análise que incluiu 20 estudos com 2930 pacientes, prevalência de AAPR em uso do AAS de 28%. A AAPR foi mais frequente em homens e em portadores de insuficiência renal e, na mesma direção dos estudos previamente citados, pacientes portadores de AAPR apresentaram maior incidência de eventos cardiovasculares (39% *versus* 16%, OR 3,85; IC 95% 3,08 a 4,80;  $p < 0,001$ ) e de mortalidade (OR 5,99; IC 95% 2,28 a 15,72;  $p < 0,003$ ).

### **1.7 Mecanismos potenciais para AAPR em uso do AAS**

Os mecanismos que explicariam a ocorrência da AAPR em uso do AAS ainda não estão totalmente esclarecidos, admitindo-se como mais provável uma interação entre fatores clínicos, biológicos (carga aterosclerótica e estado inflamatório) e genéticos.

Entre os fatores clínicos, a má aderência e a polifarmácia são considerados os mais relevantes. Cotter e cols(36) descreveram que, entre 73 pacientes com IAM prévio e usuários crônicos de AAS, 21 apresentaram testes bioquímicos compatíveis com AAPR, sendo que 12 (57,1%) desses pacientes assumiram ser pouco aderentes ao tratamento. A interação com outros medicamentos, especialmente anti-inflamatórios não hormonais(18), idade avançada e sexo feminino(17), poderia explicar alterações na farmacocinética do AAS, apesar de essas associações serem controversas.

Um outro mecanismo que poderia explicar a ocorrência da AAPR está relacionado à carga aterosclerótica. Todo o processo fisiopatológico da aterosclerose, que inclui a formação da placa, sua progressão e possível instabilização clínica, está direta e indiretamente ligado à atividade plaquetária.

Se, por um lado, a alta carga aterosclerótica promove maior reatividade plaquetária, por outro lado a alta atividade plaquetária pode acelerar a progressão e instabilização da aterosclerose. Sendo assim, acredita-se que quanto maior a carga aterosclerótica maior também a ativação plaquetária e, possivelmente, maior a AAPR em uso do AAS. A estimativa da carga aterosclerótica, tradicionalmente, é feita por meio da visualização subjetiva durante a cineangiocoronariografia, utilizando-se escores validados na literatura. Métodos mais modernos, como o ultrassom intracoronário (USIC), já estão sendo utilizados para aumentar a acurácia dessa estimativa.

Por outro lado, há muito tempo já se reconhece a relação entre a resposta inflamatória sistêmica e o estado pró-coagulante. As células e citocinas envolvidas na ativação inflamatória estimulam a produção de substâncias pró-coagulantes, inibem os fatores anticoagulantes e ainda levam à injúria endotelial. Adicionalmente, o sistema de coagulação ativado cria uma alça de retroalimentação positiva, estimulando ainda mais o sistema inflamatório(37).

Especialmente no cenário das SIMI, a interação entre inflamação, ativação plaquetária e sistema de coagulação compõe o processo fisiopatológico e alvo terapêutico principal. Alguns estudos sugerem, inclusive, que os efeitos benéficos dos antiplaquetários se devam, em parte, aos seus efeitos anti-inflamatórios diretos e indiretos(38). Por outro lado, estados

inflamatórios sistêmicos, ao aumentar a ativação plaquetária, podem reduzir a resposta antiplaquetária ao AAS.

Em relação à suscetibilidade genética, vários genes foram estudados: COX-1, COX-2, GPIa, GPIIIa, P2Y1. Porém, apenas o polimorfismo PLA1/A2 no gene da glicoproteína IIIa (GPIIIa) parece estar associado à AAPR em uso do AAS. O polimorfismo PLA1/A2 do receptor da GPIIIa implica a substituição do aminoácido Leu pela Pro na posição 33, e a presença desse aminoácido mutante foi associada com maior ligação do fibrinogênio ao receptor GPIIIa. O alelo selvagem chamado PLA1 é encontrado em cerca de 85% dos caucasianos e o PLA2 em 15%(39). Alguns estudos descrevem que os indivíduos homozigotos PLA2/PLA2 para o polimorfismo da GPIIIa são menos sensíveis à ação antiagregante do AAS nas doses convencionalmente utilizadas(40, 41).

Além dos fatores previamente descritos, a taxa de renovação plaquetária (*turnover* plaquetário) é determinante do número de plaquetas recém-formadas na circulação, portadoras da isoforma COX-2 que é pouco responsiva ao AAS nas doses habitualmente utilizadas, e de novas moléculas de COX-1 não bloqueadas. As SIMI são situações clínicas em que se espera que essa taxa de renovação plaquetária esteja aumentada de forma significativa. Uma das explicações para esse achado seria o aumento do consumo plaquetário pelo endotélio disfuncional, já documentado em pacientes portadores de microangiopatia diabética(42, 43). Sendo assim, pode-se esperar um estado transitório de hiper-reatividade plaquetária, que poderia ser revertido após o término da fase aguda. Desta forma, a alta prevalência de AAPR em uso do AAS descrita nos pacientes durante as SIMI não seria a causa dos

eventos, mas sim consequência do estado inflamatório sistêmico e da própria ruptura da placa aterosclerótica. Essa hipótese, no entanto, ainda não foi testada, até o presente momento, por nenhum estudo prospectivo voltado especificamente para avaliá-la.

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de comparar, em pacientes com SIMI sem supradesnível do segmento ST, a resposta antiplaquetária ao AAS nas fases aguda e tardia nos mesmos indivíduos.

## **2. Objetivos**

---



## 2.1 Objetivo primário

Comparar, em pacientes com SIMI sem supradesnível do segmento ST, a resposta plaquetária ao AAS nas primeiras 48 horas de evolução (fase aguda) em relação à fase tardia, 3 meses após a alta hospitalar.

## 2.2 Objetivos secundários

Avaliar a correlação entre os diferentes testes plaquetários utilizados: TXB<sub>2</sub> sérico, PFA-100®, *VerifyNow*® e agregometria de sangue total utilizando ácido aracdônico e colágeno.

- Relacionar o desfecho composto de óbito, IAM, angina instável e necessidade de revascularização e de internação, aos três meses de evolução, com os testes plaquetários.
- Avaliar a relação entre a carga aterosclerótica pela cineangiocoronariografia, com os resultados dos testes plaquetários obtidos na fase aguda. Para a análise coronariográfica três diferentes escores foram utilizados:

- 1) escore de vasos: número de vasos com estenose > 70% (0 a 3);
  - 2) escore de estenose: grau máximo de estenose em cada vaso principal (1 para 1% a 49%; 2 para 50% a 74%; 3 para 75% a 99% e 4 para 100%) escore de extensão pelo método de Sullivan(44): proporção da árvore coronariana envolvida com placas de ateroma.
- Avaliar a relação entre marcadores de atividade inflamatória [PCR ultrasensível (PCR us) e Interleucina -6 (IL-6)], com os resultados dos testes plaquetários.
  - Avaliar a resposta ao AAS nos seguintes subgrupos: Idosos ( $\geq 65$  anos) ou não; angina instável e IAM sem supradesnível do segmento ST; presença ou não de hiperglicemia ( $>125$  mg/dL); presença ou não de elevação da hemoglobina glicosilada ( $>6\%$ ); sexo masculino ou feminino; uso atual de estatinas ou não; fumante ou não (atual); uso ou não de inibidores da enzima conversora da angiotensina (atual); uso ou não de inibidores de bomba de prótons (atual).
  - Avaliar a relação entre os resultados dos testes plaquetários e presença ou não de polimorfismo do receptor plaquetário da glicoproteína IIb/IIIa.

### **3. Métodos**

---

### **3.1 Desenho**

Estudo prospectivo observacional.

### **3.2 Casuística**

70 pacientes com diagnóstico de SIMI sem supradesnível do segmento ST (angina instável e IAM sem supradesnível do segmento ST), com até 48 horas de evolução a partir do início dos sintomas.

### **3.3 Métodos**

#### **3.3.1 Critérios de inclusão**

- Idade  $\geq 18$  anos;
- Diagnóstico comprovado de SIMI sem supradesnível do segmento ST, de acordo com as diretrizes assistenciais(45), nas primeiras 48 horas do início do quadro clínico;
- Uso regular de AAS na dose de 100 a 200mg por dia por, pelo menos, sete dias antes do evento agudo.

### 3.3.2 Critérios de exclusão

- Uso prévio, nos últimos sete dias, de outro antiagregante plaquetário que não o AAS;
- Uso de antivitamina K nas últimas três semanas;
- Hemoglobina <10g/dL e/ou Hematócrito <30% ou >50%, Plaquetas <100.000/mm<sup>3</sup> ou >500.000/mm<sup>3</sup>, *clearance* de creatinina <30 mL/minuto;
- Classificação de Killip-Kimbal(46) III ou IV;
- Necessidade de medicação parenteral vasopressora ou inotrópica no momento da inclusão no estudo;
- Realização de intervenção coronária percutânea nos últimos 30 dias ou cirurgia de revascularização miocárdica nos últimos 90 dias antes da inclusão no estudo;
- Neoplasia maligna atual conhecida;
- Doenças hematológicas conhecidas;
- Recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.
- Não comparecimento à segunda visita (de seguimento) por qualquer razão, exceto óbito.

### 3.3.3 Entrevistas médicas

- a. A primeira visita foi realizada no momento da inclusão do paciente. Nessa oportunidade foram realizados:

- Anamnese;
  - Exame físico;
  - Preenchimento de questionário com características demográficas, história médica pregressa e medicações de uso prévio;
  - Checagem da aderência do paciente ao uso prévio de AAS por, pelo menos, sete dias, já que este era um importante critério para inclusão do paciente no estudo;
  - Coleta de amostras sanguíneas para as análises previstas.
- b. Ao final da hospitalização foram coletados dados de exames laboratoriais, eletrocardiograma, ecocardiograma, coronariografia e prescrição médica durante a internação. Todos os referidos procedimentos foram indicados e realizados pela equipe médica assistente, sem qualquer interferência da equipe de pesquisa.
- c. A segunda visita (de seguimento) foi realizada três meses  $\pm$  15 dias após a alta hospitalar. Foi realizado agendamento telefônico uma semana antes da entrevista, quando era novamente assegurada a aderência ao tratamento com AAS por, pelo menos, sete dias prévios à consulta. Nessa oportunidade foram realizados:
- Anamnese;
  - Exame físico;
  - Preenchimento de questionário sobre a ocorrência de novos eventos (IAM, angina instável, reinternação, necessidade de revascularização, óbito) ocorridos desde a alta hospitalar até a presente avaliação.

- Coleta de amostras sanguíneas.

### **3.4 Dosagens laboratoriais**

#### **3.4.1 Coleta de sangue**

As coletas foram realizadas na inclusão do paciente no estudo e novamente após três meses  $\pm$  15 dias durante entrevista médica ambulatorial.

A seguinte rotina foi aplicada em ambas as ocasiões:

- Punção venosa em veia antecubital calibrosa ou, na impossibilidade desta, em outra veia calibrosa, com tempo de garroteamento inferior a um minuto;
- Utilização de tubos Vacutainer® com citrato de sódio a 3,2% (CS 3,2%) para realização dos testes de agregação plaquetária, tubos secos para dosagem bioquímica e com EDTA para realização de hemograma e análise genética;
- Após descartar 2 a 3 mL iniciais de sangue os tubos eram preenchidos até a capacidade máxima e foram cuidadosamente invertidos cinco vezes para a completa mistura com o anticoagulante;
- As coletas sanguíneas foram realizadas entre 10 horas e 13 horas, sempre em dias úteis da semana (2<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> feira).

### 3.4.2 Dosagens laboratoriais

Após a coleta de sangue, os testes plaquetários foram realizados em até 120 minutos.

#### Testes plaquetários utilizados:

- PFA-100®

O PFA-100® (*Siemens Healthcare Diagnostics, Newark, Delaware*) é um método simples e de rápida execução que avalia a função plaquetária em condições de alta força de cisalhamento (*shear stress*), utilizando sangue total. Alíquotas das amostras de sangue total foram colocadas em recipientes contendo uma abertura microscópica de 147  $\mu\text{m}$ . Foram utilizados cartuchos COL/EPI nos quais a abertura é recoberta por 2  $\mu\text{g}$  colágeno e 10  $\mu\text{g}$  de epinefrina, sendo medido o tempo para o fechamento (TF) dessa abertura pelo tampão plaquetário. Quanto maior o TF, menor a agregação plaquetária. O tempo de fechamento é fornecido em segundos, sendo o tempo máximo medido de 300 segundos.

- Agregometria de sangue total (AST)

A AST mede a impedância elétrica (amplitude) entre dois eletrodos imersos no sangue total após a adição de um agonista, utilizando agregômetro automatizado. Alíquotas das amostras de sangue total foram diluídas (1:1) com salina estéril (0,9%) e aquecidas a 37° Celsius por 5 minutos na curveta. Em seguida, os eletrodos foram colocados nos tubos e adicionados os reagentes para uma concentração de colágeno a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Chrono-Log; *Havertown,*



*Pennsylvania*) e ácido aracdônico a 0,5 µg/mL (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri*). O valor máximo da impedância foi medido pelos dois eletrodos imersos na amostra em 10 minutos, no aparelho padrão (*Chrono-Log Corporation, Havertown, Pennsylvania, USA, Model 700-4 Whole Blood*). Os valores foram expressos em ohms ( $\Omega$ ), quanto maior a impedância, maior a agregação plaquetária.

- *Verify Now® Aspirin (VFN)*

O *VerifyNow® (Accumetrics, Inc., San Diego, California, USA)* é um sistema de detecção óptica turbidimétrico que mede a agregação plaquetária utilizando o sangue total. Alíquotas das amostras de sangue total foram colocadas em cartuchos contendo uma preparação padrão liofilizada de fibrinogênio e ácido aracdônico. À medida que a agregação ocorre, o sistema converte a luminosidade transmitida em unidades de reação ao AAS (URA). Quanto maior a URA, maior a agregação plaquetária.

- *TXB<sub>2</sub> sérico*

Amostras de sangue total no tubo com CS a 3,2% foram centrifugadas a 300rpm, sendo coletadas alíquotas de soro e depois congeladas a 80°C negativos. Posteriormente as amostras foram analisadas pelo método de enzimaímunensaio (EIA) para a dosagem do TXB<sub>2</sub> sérico, utilizando o *Biotrak Thromboxane B<sub>2</sub> enzymeimmunoassay system (GE Healthcare, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)*. A sensibilidade do teste é de 0,2 pg.

### 3.4.3 Testes de avaliação da atividade inflamatória

- PCR us

A PCR us foi quantificada por meio de anticorpos monoclonais, pelo método de imunonefelometria de detecção ultrasensível em equipamento automatizado BN II Systems, utilizando o kit CARDIO PHASE® hs CRP (Siemens Healthcare Diagnostics Products, Marburg, Alemanha).

- IL-6

Amostras de sangue total no tubo com CS a 3,2% foram centrifugadas a 300rpm, sendo coletadas alíquotas de soro e depois congeladas a 80°C negativos. Posteriormente, a IL-6 foi determinada no soro dos pacientes com a utilização do método de quimiluminescência (ensaio imunométrico sequencial de fase sólida, de enzimas químico-luminosas), e do aparelho IMMULITE 1000 (Siemens Healthcare, Llamberis, Gwynedd, UK). A sensibilidade do teste é de 2pg/mL.

### 3.4.4 Determinação genética do polimorfismo do receptor da GPIIb/IIIa

O DNA genômico foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico por método de precipitação salina, segundo o protocolo descrito a seguir.

Oito mL de sangue foram transferidos para um tubo de 50 mL e o volume completado para 30 mL com tampão A (1mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  + 144mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e deixada a 4°C por

10 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi submetido ao mesmo procedimento descrito acima. O sedimento leucocitário foi finalmente ressuspenso em 3 mL de tampão B (10 mM Tris-HCl pH 8 + 400 mM NaCl + 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8) + 200 µL de SDS 10% + 500 µL de tampão C (50 µL de SDS 10% + 2µL de Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M pH 8 + 488 mL de água destilada) com proteinase K (2 µL de proteinase K 20 mg/mL diluída em 5 mL de tampão C) e deixado a 37°C entre 12 e 18 horas. A segunda parte do protocolo começa com a adição de 1 mL de solução D (NaCl 6 M), vigorosamente agitada em vórtex por 1 minuto e em seguida centrifugada a 4°C por 20 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL e a ele foram adicionados 10 mL de etanol absoluto gelado. Com uma leve agitação já se nota a precipitação do DNA, que pode ser retirado cuidadosamente e transferido para um *ependorf* de 1,5 mL de capacidade contendo 1 mL de etanol 70% gelado. O *ependorf* foi então centrifugado a 4°C por 15 minutos a 13500rpm, o etanol descartado e o sedimento (DNA) deixado em temperatura ambiente até estar totalmente seco. Em seguida, este *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8 + 1 mM EDTA pH 8).

Após a completa diluição, a determinação da concentração do DNA foi realizada diluindo-se 20 µL do material em 980 µL de TE. Em seguida, a mistura foi submetida à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A concentração final foi corrigida para 100 ng/µL no tubo de estoque e para 10 ng/µL no tubo de uso.

### 3.4.5 Análises dos polimorfismos genéticos

As análises dos genótipos para os polimorfismos nos genes *GP1IIa* (rs5918) foram realizadas por amplificação do DNA genômico por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*), seguida por análise da curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*).

Para este procedimento, as reações são otimizadas no aparelho Rotor Gene 6000® (*Qiagen, Courtaboeuf, France*), utilizando-se o reagente fluorescente DNA-intercalante SYTO9® (*Invitrogen, Carlsbad, USA*). A reação é constituída por 1 µL (10ng) de DNA genômico, 2 µL de tampão de reação (MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 200mM), 0,4 µL do *primer* (200 nM), 0,6 µL de SYTO9® (1,5 mM), 0,5 U de BioTaq Polimerase DNA (Bioquímica, Brasil) e água para PCR completando para 10 µL.

Na fase da análise da curva de *melting* (HRM), o aparelho mensura a fluorescência emitida pela reação a cada aumento de 0,1°C de temperatura na faixa de 70-94°C. A curva de *melting* é gerada pela diminuição da fluorescência com o aumento da temperatura e, na análise, os nucleotídeos polimórficos geram padrões de curva diferenciados em relação aos nucleotídeos selvagens.

Amostras de três curvas observadas são submetidas ao sequenciamento direto (*ABI Terminator Sequencing Kit*® e sequenciador ABI 3500® – *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.*) para a confirmação dos genótipos indicados pelo HRM.

### 3.4.6 Definições de Alta Atividade Plaquetária Residual em uso de AAS de acordo com os testes plaquetários

- PFA-100®: TF < 150 segundos;
- *VerifyNow*®: ≥ 550 URA;
- AST com AA: ≥ 3 Ω;
- AST com Colágeno: ≥ 10 Ω;
- TXB<sub>2</sub> sérico: ≥ 10pg/mL.

### 3.4.7 Análises estatísticas

#### 3.4.7.1 Cálculo amostral:

O teste de McNemar foi aplicado no cálculo amostral levando em conta as seguintes hipóteses: média da agregação plaquetária medida por meio do PFA-100® de 191 segundos +/- SD 100(47) durante a fase aguda e um decréscimo de 25% nesta agregabilidade durante a fase tardia. Para um poder estatístico de 80% e alfa de 0,05, são necessários 70 pacientes (lembrando que os pacientes são controles de si próprios).

### 3.4.7.2 Análise estatística:

Os dados contínuos foram inicialmente comparados com a curva de Gauss utilizando-se o teste de distância K-s e Shapiro-wilk. Quando classificados em paramétricos foram representados como média e desvio-padrão da amostra. Quando não paramétricos foram representados como mediana e percentil. Para a comparação de dois grupos independentes utilizou-se o teste de Mann Whitney para os dados não paramétricos e o teste T de Student não pareado com a correção de Welch quando necessário para dados paramétricos. Na comparação de dois tempos utilizou-se o teste de Wilcoxon para dados não paramétricos e teste t de Student não pareado para dados paramétricos. Os dados categóricos foram representados na frequência absoluta e relativa. A distribuição das tabelas de contingência foi analisada pelo Qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher. A comparação dos quatro grupos em relação às variáveis contínuas foi realizada utilizando-se a Análise de Variância de um fator. Para a análise dos grupos de genótipos nas duas fases foi utilizada a Análise de Variância com medidas repetidas. O estudo de correlação foi realizado por meio do coeficiente de correlação de *Spearman*. A concordância entre as classificações de métodos foi calculada através do índice Kappa. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## **4. Resultados**

---

#### 4.1 Características basais da população

Foram selecionados 78 pacientes com diagnóstico inicial de SIMI sem supradesnível do segmento ST. Dos 78 pacientes inicialmente selecionados, 8 foram excluídos por não preencherem critérios de inclusão e exclusão: 2 pacientes apresentavam hemoglobina <10g/dL; 1 paciente retirou o consentimento informado; 4 pacientes não compareceram à visita de seguimento (1 paciente não retornou e não pôde ser localizado apesar de intensos esforços da equipe, 1 paciente estava em uso de dupla antiagregação plaquetária por orientação do seu médico e não poderia suspender o clopidogrel; 2 pacientes se recusaram a realizar a segunda visita); 1 paciente não foi submetido à análise laboratorial por problemas logísticos quando da sua entrevista de controle (falta dos testes laboratoriais).

As características basais dos 70 pacientes incluídos na presente análise estão sumarizadas na **Tabela 1**. Como se pode notar, a idade média da população foi de  $64 \pm 9,7$  anos, sendo 54% do sexo feminino. Em relação aos antecedentes médicos, hipertensão estava presente em 87%, dislipidemia em 83%, e diabetes em 49%. Cinquenta e oito por cento dos pacientes relatavam história pregressa de IAM e 54% de angioplastia ou cirurgia de revascularização. Apenas 8% dos pacientes relataram ter diagnóstico prévio de insuficiência cardíaca congestiva.

O diagnóstico feito pela equipe assistente foi de angina instável em 77% dos pacientes e de IAM sem supradesnível de ST em 22%. De acordo com a classificação de risco TIMI para SIMI sem supradesnível do segmento



ST, a maioria dos pacientes (64%) apresentava risco moderado (três ou quatro pontos). As medicações de uso prévio também estão descritas na **Tabela 1**.

Os exames laboratoriais realizados na admissão estão descritos na **Tabela 2**. Seus resultados demonstraram níveis hematimétricos (nas suas medianas) dentro da normalidade. A mediana da hemoglobina foi de 13,7g/dL, leucócitos 8.000/mm<sup>3</sup> e plaquetas 220.000/mm<sup>3</sup>. Os parâmetros de função renal utilizados (ureia, creatinina e *clearance* de creatinina) mostraram valores de mediana de 39,5mg/dL, 1,01mg/dL e 60mL/minuto, respectivamente. O perfil lipídico mostrou valores próximos às metas de controle, tendo em vista que 80% da população referia uso prévio de estatinas. A primeira glicemia dosada laboratorialmente apresentou mediana de 115 mg/dL e a hemoglobina glicosilada,6,2%.

**Tabela 1 - Características basais dos pacientes na admissão**

Idade em anos (média $\pm$ DP)	64,2 $\pm$ 9,7
Sexo feminino (%)	54,3
<b>Antecedentes Médicos</b>	
Diabetes (%)	48,6
Hipertensão (%)	87,1
Dislipidemia (%)	82,9
Tabagismo atual (%)	15,7
Obesidade (%)	22,9
História familiar para DAC (%)	40
IAM prévio (%)	58,6
ATC ou RM prévios (%)	54,3
Insuficiência Cardíaca (%)	8,6
<b>Diagnóstico na Admissão</b>	
Angina Instável (%)	77,1
IAM sem supra de ST (%)	22,9
<b>Classificação TIMI de Risco</b>	
0 a 2 (%)	21
3 e 4 (%)	64
$\geq$ 5 (%)	15
<b>Medicações de uso prévio</b>	
Inibidores de bomba de prótons (%)	45,7
Betabloqueadores (%)	78,6
Bloqueadores de Canal de Cálcio (%)	15
IECA/BRA (%)	64,3
Espironolactona (%)	4,3

Legendas: DAC: doença arterial coronariana; ATC: angioplastia transluminal coronariana; RM: cirurgia de revascularização miocárdica; IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina; BRA: bloqueadores do receptor da angiotensina.

**Tabela 2 - Resultados dos exames laboratoriais realizados na admissão**

<b>Exames</b>	<b>Mediana (p25/p75)</b>
Hemoglobina (g/dL)	13,7 (12,8/14,7)
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	8.000 (6.480/9.150)
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	220.000 (179.000/273.000)
Creatinina (mg/dL)	1,01 (0,89/1,18)
Ureia (mg/dL)	39,5 (33/47,25)
<i>Clearance</i> de Creatinina (mL/min)	60 (58/60)
Colesterol Total (mg/dL)	170 (146,25/204)
LDL Colesterol (mg/dL)	98 (76,75/122)
HDL Colesterol (mg/dL)	38,5 (32,75/45)
Triglicérides (mg/dL)	149,5 (107,75/231)
Glicemia (mg/dL)	115 (95/147)
Hemoglobina Glicosilada (%)	6,25 (5,8 / 7,08)
CKMB (ng/mL)	4,26 (2,88 /7,36)
Troponina (ng/mL)	0,2 (0,2/0,29)

Legenda: p25: percentil 25; p75: percentil 75; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade.

Ecocardiogramas foram realizados em apenas 39 pacientes, lembrando que a indicação do exame era realizada pela equipe médica assistente, sem a participação dos investigadores. A principal explicação para esse baixo percentual de realização de ecocardiogramas decorre de uma parcela significativa dos pacientes terem sido manejados na Unidade de Emergência sem hospitalização. A mediana da fração de ejeção foi de 56% e do diâmetro diastólico 50mm.

Sessenta e um pacientes foram submetidos à cineangiocoronariografia, sempre a critério da equipe médica assistente. A média  $\pm$  desvio-padrão do

escore de vasos foi de  $1,93 \pm 1,12$ ; escore de estenose de  $12,84 \pm 8,03$ ; e de extensão de  $57,43 \pm 65,04$ .

Todos os pacientes incluídos no estudo estavam em uso de AAS na dose de 100 ou 200mg por dia. Tanto na fase aguda quanto na fase tardia 85% dos pacientes utilizavam AAS na dose de 100mg por dia, enquanto 15% utilizavam 200mg por dia. Dois pacientes utilizavam 200mg por dia na fase aguda e passaram a usar 100mg por dia na fase tardia e dois pacientes utilizavam 100mg por dia na fase aguda e passaram a usar 200mg por dia na fase tardia.

#### **4.2 Objetivo primário: Comparação dos testes plaquetários entre as fases aguda e tardia.**

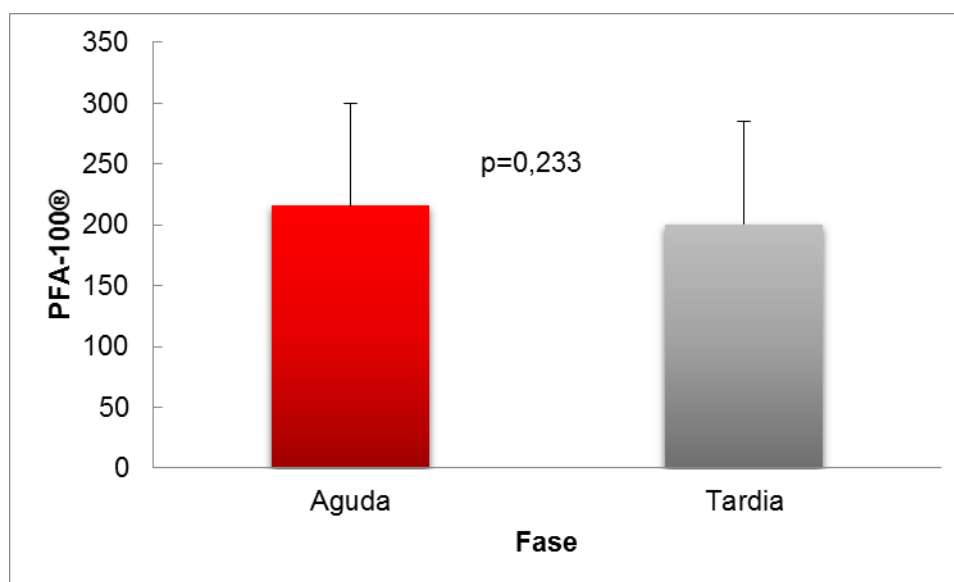
O resultado da agregação plaquetária média em resposta ao AAS, aferida pelo PFA-100®, foi similar na fase aguda em relação à fase tardia ( $215,9 \pm 83,75$  segundos *versus*  $200,51 \pm 84,63$  segundos,  $p=0,233$ ) (**Tabela 3** e **Figura 3**). Por outro lado, valores significativamente maiores da agregabilidade plaquetária foram detectados na fase aguda, em relação à fase tardia, quando utilizados os testes funcionais COX-1 específicos (**Tabela 4** e **Figuras 4** e **5**) (AST com AA e VFN®): para AST  $3,06 \pm 4,81$  *versus*  $1,69 \pm 3,96$ ;  $p=0,029$ , e para VFN  $504,39 \pm 72,32$  *versus*  $473,71 \pm 64,12$ ;  $p=0,004$ . Os outros testes funcionais COX-1 não específicos (AST com colágeno, além dos resultados já descritos do PFA-100®) e o teste bioquímico (TXB<sub>2</sub>) não

mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as duas fases analisadas, como se pode notar na **Tabela 3**.

**Tabela 3 - Testes plaquetários: comparação entre as fases aguda e tardia**

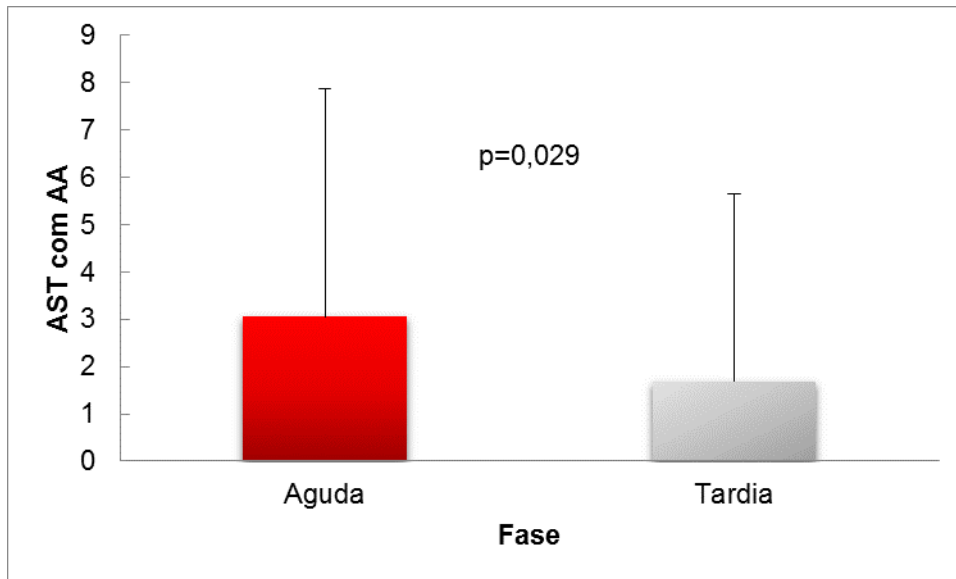
Teste	Fase Aguda		Fase Tardia		p
	Média	± DP	Média	± DP	
PFA	215,9	83,75	200,51	84,63	0,233
AST com AA	3,06	4,81	1,69	3,96	0,029
VFN	504,39	72,32	473,71	64,12	0,004
AST com Col	7,19	5,64	6,46	5,09	0,658
TXB <sub>2</sub>	6,97	16,33	5,03	12,34	0,861

Legendas: DP: desvio-padrão; AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; PFA: *platelet function analyzer*®; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p.



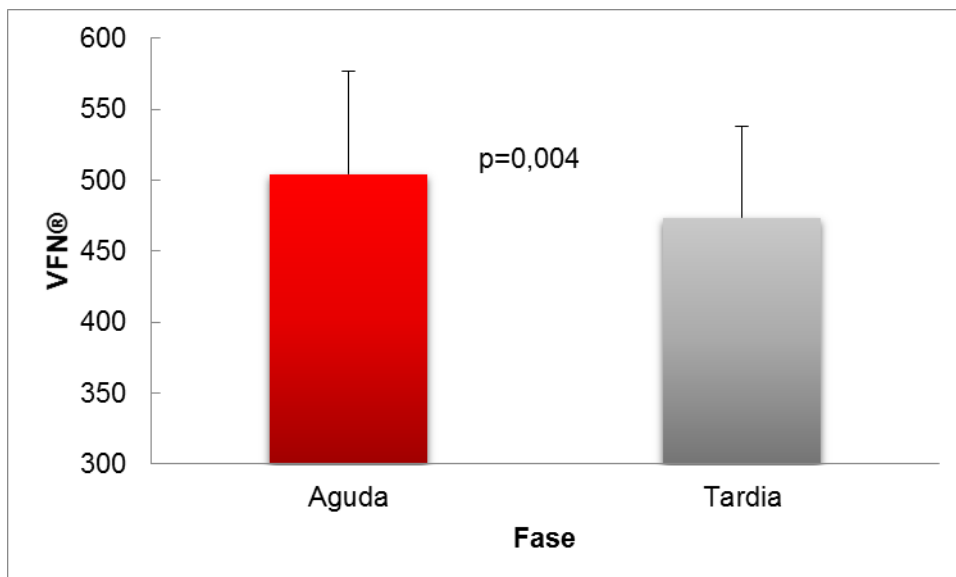
Legendas: PFA: *platelet function analyzer*®; p: valor de p.

**Figura 3 - Resultados do PFA: comparação entre as fases aguda e tardia**



Legenda: AST com AA: agregometria de sangue total com ácido aracdônico; p: valor de p.

**Figura 4 -** Resultados do AST com AA: comparação entre as fases aguda e tardia



Legenda: VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p.

**Figura 5 -** Resultados do VFN: comparação entre as fases aguda e tardia.

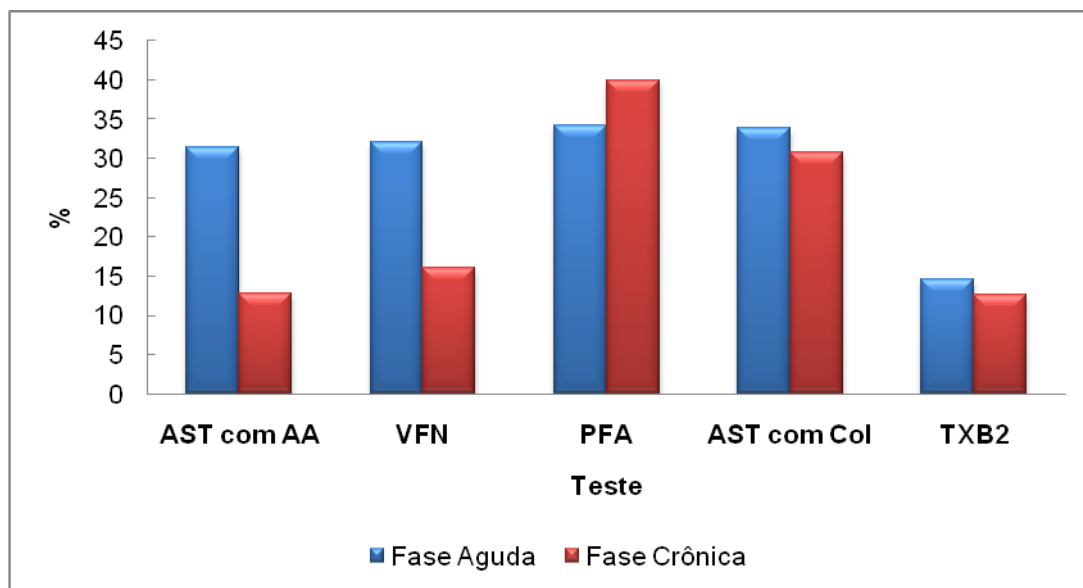
As análises foram repetidas excluindo-se os quatro pacientes que haviam modificado a dose do AAS na fase aguda em relação à fase tardia, e os resultados foram similares aos apresentados na **Tabela 3**.

Quando os resultados dos testes plaquetários foram categorizados de acordo com os valores de corte previamente descritos (ver metodologia), os resultados foram similares, com os testes funcionais COX-1 específicos (AST com AA e VFN) mantendo diferenças estatisticamente significativas na fase aguda em relação à fase tardia (prevalência de AAPR em uso do AAS pela AST com AA: 31,4% *versus* 12,8%,  $p=0,015$ ; e pelo VFN: 32,1% *versus* 16%,  $p=0,049$ ). Já os testes COX-1 não específicos (AST com colágeno e PFA) e o teste bioquímico (TXB<sub>2</sub>) não mostraram diferenças estatisticamente significativas da fase aguda em relação à fase tardia (**Tabela 4 e Figura 6**).

**Tabela 4 - Prevalência de AAPR: comparação entre as fases aguda e tardia**

Teste	Fase Aguda	Fase Tardia	p
	AAPR	AAPR	
PFA	34,2%	40%	0,503
AST com AA	31,4%	12,8%	0,015
VFN	32,1%	16%	0,049
AST com Col	33,8%	30,8%	0,860
TXB <sub>2</sub>	14,6%	12,6%	1,000

Legendas: AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; PFA: *platelet function analyzer*®; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p.



Legendas: AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; PFA: *platelet function analyzer*®; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p.

**Figura 6 -** Prevalência de AAPR: comparação entre as fases aguda e tardia

A partir dos achados descritos, os pacientes foram separados em quatro grupos de acordo com os resultados dos testes COX-1 específicos (AST com AA e VFN) nas fases aguda e tardia:

**Grupo A:** Resposta Adequada na fase aguda (-) → Adequada na fase tardia (-)

**Grupo B:** Resposta Adequada na fase aguda (-) → AAPR na fase tardia (+)

**Grupo C:** AAPR na fase aguda (+) → AAPR na fase tardia (+)

**Grupo D:** AAPR na fase aguda (+) → Adequada na fase tardia (-)

Na **Tabela 5** está demonstrada a distribuição dos quatro grupos de acordo com os dois testes COX-1 específicos (AST com AA e VFN) utilizados.



O índice Kappa (teste de concordância) foi igual a 0,416 ( $p < 0,001$ ), indicando que 67,9% dos pacientes foram classificados da mesma forma nos dois métodos.

**Tabela 5 - Distribuição dos pacientes nos quatro grupos de acordo com o AST com AA e VFN**

Grupos	AST com AA	VFN
<b>A (-)/(-)</b>	60% (42)	60,71% (34)
<b>B (-)/(+)</b>	8,57%(6)	7,14%(4)
<b>C (+)/(+)</b>	4,29% (3)	8,93%(5)
<b>D(+)/(-)</b>	27,14% (19)	23,21% (13)

AST com AA: agregometria de sangue total com ácido aracdônico; VFN: *VerifyNow*®.

Na **Tabela 6** são descritas as características basais dos pacientes na admissão de acordo com os grupos de respostas pela AST com AA. Como se pode notar, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação a essas variáveis nos quatro grupos.

**Tabela 6 -** Características basais dos pacientes de acordo com os grupos pelo AST com AA

	(-)/(-) (n=42)	(-)/(+) (n=6)	(+)/(+) (n=3)	(+)(-) (n=19)	p
Idade (média ± DP)	64,26(8,63)	69,5(15,6)	62,67(11,93)	62,68(10,03)	0,738
Feminino (%)	59,52	50	66,67	42,11	0,595
<b>Antecedentes Médicos</b>					
DM (%)	42,86	50	33,33	63,16	0,521
HAS (%)	83,33	100	100	89,47	0,763
Dislipidemia (%)	78,57	83,33	100	89,47	0,832
Tabagismo* (%)	14,29	16,67	0	21,05	0,927
Obesidade (%)	21,43	50	0	21,05	0,415
HF + DAC (%)	38,10	33,33	33,33	47,37	0,886
IAM prévio (%)	59,52	50	66,67	57,89	0,970
ATC/RM <sub>prévio</sub> (%)	52,38	50	66,67	57,89	0,971
ICC (%)	11,9	0	0	5,26	0,854
<b>Diagnóstico na Admissão</b>					
AI (%)	76,19	100	33,33	78,95	0,181
IAMSST (%)	23,81	0	66,67	21,05	0,181
<b>Classificação TIMI de Risco</b>					
0 a 2 (%)	26,19	16,67	33,33	10,53	0,717
3 e 4 (%)	59,52	83,33	66,67	68,42	
≥ 5 (%)	14,29	0	0	21,05	

Legendas: DM: diabetes mellitus; HAS: hipertensão arterial sistêmica; HF+: história familiar positiva; DAC: doença arterial coronariana; IAM: infarto agudo do miocárdio; ATC: angioplastia transluminal coronariana; RM: cirurgia de revascularização miocárdica; ICC: insuficiência cardíaca; AI: angina instável; IAMSST: infarto agudo do miocárdio sem supradesnível de ST.

A **Tabela 7** demonstra as características basais dos pacientes na admissão dos quatro grupos de respostas pelo VFN. De acordo com os resultados encontrados, os pacientes do grupo C pelo VFN (resposta inadequada na fase aguda e na fase tardia) tinham mais frequentemente

história prévia de diabetes que o grupo B (n=4, 100% versus n=0, p=0,045). As outras características não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos quatro grupos.

**Tabela 7 - Características basais dos pacientes de acordo com os grupos pelo VFN**

	(-)/(-) (n=34)	(-)/(+) (n=4)	(+)/(+) (n=4)	(+)/(-) (n=13)	P
Idade (média ± DP)	65,52(8,53)	57,25(6,02)	67,4(40,69)	62,23(9,14)	0,145
Feminino (%)	55,88	50	80	38,46	0,488
<b>Antecedentes Médicos</b>					
DM (%)	41,18	0	100	69,23	0,045
HAS (%)	85,29	100	100	84,62	1,00
Dislipidemia (%)	85,29	100	100	76,92	0,727
Tabagismo* (%)	8,82	25	20	7,69	0,428
Obesidade (%)	23,53	50	0	46,15	0,129
HF + DAC (%)	32,35	75	20	61,54	0,116
IAM prévio (%)	61,76	50	80	53,85	0,799
ATC/RM prévio (%)	58,82	50	60	30,77	0,345
ICC (%)	5,88	0	0	7,69	1,00
<b>Diagnóstico na Admissão</b>					
AI (%)	82,35	50	100	76,92	0,275
IAMSST (%)	17,65	50	0	23,08	0,275
<b>Classificação TIMI de Risco</b>					
0 a 2 (%)	29,41	25	33,33	0	0,432
3 e 4 (%)	55,88	75	66,67	100	
≥ 5 (%)	14,71	0	0	0	

Legendas: DM: diabetes mellitus; HAS: hipertensão arterial sistêmica; HF+: história familiar positiva; DAC: doença arterial coronariana; IAM: infarto agudo do miocárdio; ATC: angioplastia transluminal coronariana; RM: cirurgia de revascularização miocárdica; ICC: insuficiência cardíaca; AI: angina instável; IAMSST: infarto agudo do miocárdio sem supradesnível de ST.

### 4.3 Relação entre o desfecho composto de óbito, IAM, angina instável e necessidade de revascularização e de internação, aos três meses de evolução, com níveis de agregação plaquetária

Aos três meses de seguimento dez pacientes relataram eventos, sendo que não houve óbito, IAM ou revascularização. Cinco pacientes apresentaram angina e sete pacientes foram reinternados (dois pacientes foram reinternados por angina e cinco pacientes por dispneia). Quando se comparou as médias  $\pm$  desvio-padrão dos testes plaquetários realizados na fase aguda, não houve diferenças significativas entre os pacientes com eventos cardiovasculares maiores em três meses e os pacientes livres de eventos (**Tabela 8**).

**Tabela 8 - Comparação entre os níveis de agregação plaquetária da fase aguda em relação à incidência de eventos (IAM, angina, óbito, reinternação e revascularização) em três meses.**

Teste	Eventos		Livre de Eventos		P
	Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP	
AST com AA	3,6	5,6	2,9	4,7	0,741
VFN	499,8	91,1	505,3	68,9	0,679
AST com Col	6,82	7,1	7,3	5,4	0,554
PFA	219,6	85,8	215,2	84,1	0,927
TXB <sub>2</sub>	7,6	19,8	6,8	15,8	0,842

Legendas: DP: desvio-padrão; AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; PFA: *platelet function analyzer*®; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p.

Quando se comparou os grupos de acordo com a resposta ao AST com AA e ao VFN (A, B, C, D) em relação à incidência de eventos, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre eles (**Tabela 9**). Pelo teste qui-quadrado para tendência linear observou-se que não há tendência significativa da presença de eventos em relação à gravidade dos grupos de AST com AA ( $p=0,914$ ) e VFN ( $p=0,680$ ).

**Tabela 9 - Comparação da incidência de eventos entre os grupos de acordo com o AST com AA e com o VFN**

	(-)/(-) (n=42)	(-)/(+) (n=6)	(+)/(+) (n=3)	(+)(-) (n=19)	p
<b>AST AA</b>					
<b>Eventos</b>	N=7 16,70%	N=0 0,00%	N=0 0,00%	N=4 21,10%	0,549
<b>VFN</b>					
<b>Eventos</b>	N=6 17,60%	N=0 0,00%	N=0 0,00%	N=3 23,10%	0,62

Legendas: AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p.

#### 4.4 Correlação entre os diferentes testes plaquetários utilizados: TXB<sub>2</sub>, PFA, VFN e AST com AA e AST com Colágeno

Como demonstrado na **Tabela 10**, os testes de agregação realizados na fase aguda apresentaram correlação estatisticamente significativa entre eles, à exceção do TXB<sub>2</sub> com a AST com colágeno. No entanto, a magnitude dessa correlação foi considerada moderada ( $>0,4$ ) somente entre AST com AA

e AST com colágeno e entre VFN e TXB<sub>2</sub>. As demais correlações foram consideradas fracas (>0,2 e 0,4).

**Tabela 10 - Correlação dos testes de agregação plaquetária na fase aguda**

		AST AA	AST Col	TXB <sub>2</sub>	VFN
<b>PFA</b>	<i>r<sub>s</sub></i>	-0,429	-0,281	-0,362	-0,279
	P	<0,001	0,019	0,003	0,032
<b>AST AA</b>	<i>r<sub>s</sub></i>		0,498	0,315	0,393
	P		<0,001	0,010	0,002
<b>AST Col</b>	<i>r<sub>s</sub></i>			0,150	0,318
	P			0,234	0,015
<b>TXB<sub>2</sub></b>	<i>r<sub>s</sub></i>				0,472
	P				<0,001

Legendas: AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; PFA: *platelet function analyzer*; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p; *r<sub>s</sub>*: coeficiente de correlação de Spearman.

**Tabela 11 - Correlação dos testes plaquetários na fase tardia**

		AST AA	AST Col	TXB <sub>2</sub>	VFN
<b>PFA</b>	<i>r<sub>s</sub></i>	-0,340	-0,524	-0,159	-0,356
	P	0,004	<0,001	0,198	0,004
<b>AST AA</b>	<i>r<sub>s</sub></i>		0,414	0,191	0,433
	P		<0,001	0,121	<0,001
<b>AST Col</b>	<i>r<sub>s</sub></i>			0,260	0,566
	P			0,035	<0,001
<b>TXB<sub>2</sub></b>	<i>r<sub>s</sub></i>				0,312
	P				0,014

Legendas: AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; PFA: *platelet function analyzer*; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p; *r<sub>s</sub>*: coeficiente de correlação de Spearman.

A **Tabela 11** descreve a correlação entre os testes plaquetários realizados na fase tardia. Nessa fase os testes apresentaram correlação estatisticamente significativa entre eles, à exceção do TXB<sub>2</sub> com o PFA e com AST com AA. A magnitude dessa correlação foi considerada moderada (>0,4) entre AST com colágeno e PFA, entre AST com colágeno e AST com AA, entre AST com AA e VFN, entre AST com colágeno e VFN. A correlação foi fraca (>0,2 e <0,4) entre os demais.

#### 4.5 Relação entre a carga aterosclerótica pela cineangiocoronariografia e os testes plaquetários

De acordo com as análises realizadas, não se encontrou correlação significativa entre os escores angiográficos de extensão e de estenose, e os resultados dos testes plaquetários obtidos durante a fase aguda, como se nota na **Tabela 12**.

**Tabela 12 - Correlação entre os escores angiográficos de extensão e de estenose e os resultados dos testes plaquetários na fase aguda**

		PFA	AST AA	AST Col	TXB <sub>2</sub>	VFN
<b>CATE EXT</b>	$r_s$	-0,003	-0,011	0,005	-0,033	0,104
	p	0,9781	0,931	0,968	0,803	0,457
<b>CATE EST</b>	$r_s$	0,567	-0,209	-0,170	0,032	0,074
	p	0,664	0,104	0,193	0,807	0,594

Legendas: CATE EXT: escore angiográfico de extensão; CATE EST: escore angiográfico de estenose; PFA: *platelet function analyzer*; AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p;  $r_s$ : coeficiente de correlação de Spearman.

De acordo com os resultados do escore angiográfico de vasos, nove (14,75%) pacientes não tinham estenose >70% em nenhuma das três artérias coronárias principais, e 27 (44,26%) tinham estenose >70% nas três referidas artérias (**Tabela 13**).

**Tabela 13 - Distribuição dos pacientes de acordo com o escore angiográfico de vasos**

CATE VAS	N	%
0	9	14,75
1	13	21,31
2	12	19,67
3	27	44,26

Legenda: CATE VAS: escore angiográfico de vasos.

Quando se analisou a relação entre o escore angiográfico de vasos e os resultados de fase aguda dos testes plaquetários, não se encontrou associação significativa entre as variáveis (**Tabela 14**).



**Tabela 14 - Relação entre o escore angiográfico de vasos e os resultados de fase aguda dos testes plaquetários**

CATEVAS	0	1	2	3	p
<b>PFA</b> média (DP)	225,88 (93,32)	208,46 (92,73)	168,58 (73,57)	226,66 (81,86)	0,192
<b>AST AA</b> média (DP)	2,11 (2,97)	5 (5,58)	3,83 (6,58)	2,11 (4,22)	0,354
<b>AST Col</b> média (DP)	6,88 (5,08)	7,30 (6,19)	8,33 (6,93)	6,11 (4,88)	0,853
<b>TXB<sub>2</sub></b> média(DP)	4,08 (8,55)	14,3 (25,4)	2,96 (5,09)	6,98 (17,4)	0,98
<b>VFN</b> média(DP)	488,87 (48,41)	529,18 (62,41)	494,40 (76,32)	513,75 (78,69)	0,471

Legendas: CATEVAS: escore angiográfico de vasos; PFA: *platelet function analyzer*; AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p.

#### 4.6 Relação entre PCR e IL-6 com os testes plaquetários

Os marcadores inflamatórios dosados foram a PCR ultrasensível e a IL-6. Quando se comparou os valores da fase aguda com a fase tardia, somente a PCR apresentou resultados significativamente superiores na fase aguda em relação à fase tardia (**Tabela 15**). A IL-6, apesar de apresentar uma tendência (demonstrada pelo percentil 75), não alcançou significância estatística.

**Tabela 15 - Comparação dos marcadores inflamatórios (PCR e IL-6) na fase aguda versus a fase tardia**

	Aguda			Tardia			p
	p25	Mediana	p75	p25	Mediana	p75	
<b>IL-6</b>	2,0	2,1	5,68	2,0	2,0	3,25	0,110
<b>PCR us</b>	1,54	2,84	8,41	0,73	1,41	5,64	0,006

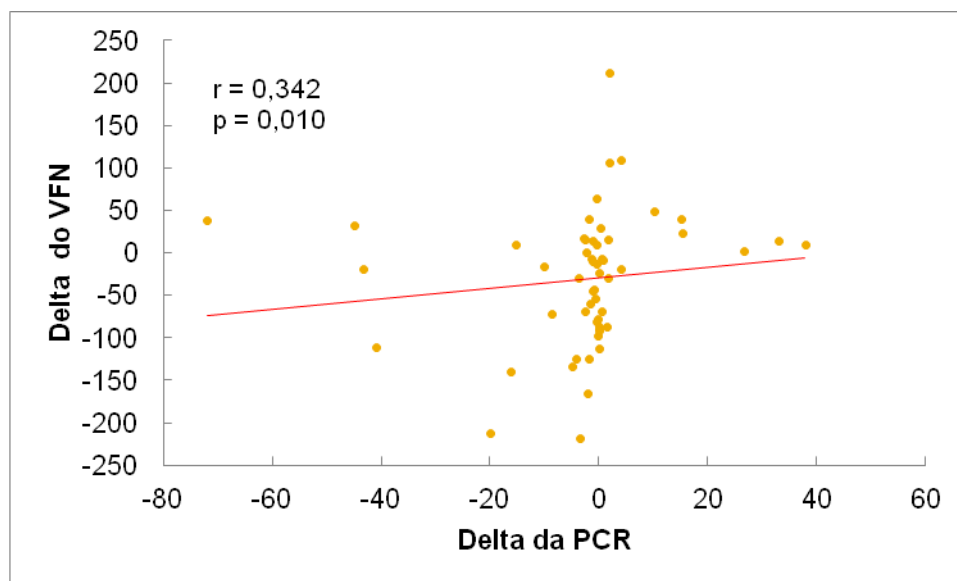
Legendas: p25: percentil 25; p75: percentil 75; IL-6: interleucina 6; PCR us: proteína C reativa ultrasensível.

Quando se analisou a variação dos marcadores inflamatórios (fase tardia – fase aguda) e dos testes plaquetários, foi encontrada uma correlação fraca, porém significativa, entre o delta da PCR e do VFN ( $r_s$  0,34;  $p=0,01$ ) (Tabela 16 e Figura 7).

**Tabela 16 - Correlação entre a variação dos marcadores inflamatórios e dos testes plaquetários (fase tardia – fase aguda)**

		PFA	AST AA	AST Col	TXB <sub>2</sub>	VFN
<b>PCR us</b>	$r_s$	-0,116	0,101	0,129	0,233	0,342
	p	0,339	0,408	0,298	0,068	0,01
<b>IL-6</b>	$r_s$	0,104	-0,149	-0,095	0,014	-0,016
	p	0,421	0,249	0,469	0,915	0,911

Legendas: PCR us: proteína C reativa ultrasensível; IL-6: interleucina-6; PFA: *platelet function analyzer*; AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p;  $r_s$ : coeficiente de *Spearman*.



Legenda: PCR: proteína C reativa; VFN: *VerifyNow*®; r: coeficiente de *Spearman*®

**Figura 7:** Correlação entre a variação da PCR e do VFN (fase tardia – fase aguda)

#### 4.7 Análises de subgrupos

Foram analisados nove subgrupos pré-especificados em relação aos resultados dos testes plaquetários AST com AA e VFN na fase aguda e na variação entre as fases aguda e tardia (fase tardia – fase aguda). Na **Tabela 17** estão demonstrados os resultados destas análises; como se pode notar, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos analisados.

**Tabela 17 - Análise de subgrupos em relação à variação dos testes AST com AA e VFN (fase tardia – aguda)**

	$\Delta$ AST AA	P	$\Delta$ VFN	p
$\geq$ 65 anos	-0,69 (7,2)	0,368	-23,51 (65,37)	0,257
< 65 anos	-2,05 (5,01)		-44,60 (99,46)	
Masculino	-0,62 (5,31)	0,079	-16,4 (53,55)	0,100
Feminino	-2,31 (6,98)		-53,29 (105,72)	
Tabagismo	-2,2 (6,95)	0,500	-37 (139,05)	0,443
Não Tabagismo	-1,27 (6,06)		-33,5 (76,99)	
Glic $\geq$ 126mg/dL	-2,04 (6,27)	0,630	-26,25 (75,78)	0,337
Glic <126mg/dL	-0,47 (6,38)		-43,53 (96,08)	
HBg >6%	-1,65 (6,4)	0,936	-39,42 (93,18)	0,891
HBg $\leq$ 6%	-1,14 (6,1)		-32,9 (69,2)	
AI	-1,14 (6,55)	0,945	-34,15 (80,09)	0,723
IAMSST	-2,33 (4,49)		-32,72 (102,18)	
Estatina	-1,6 (6,7)	0,234	-38,24 (89,6)	0,342
Sem estatina	-0,53 (2,78)		-17,5 (57,04)	
IECA	-1,51 (6,57)	0,486	-28,14 (90,75)	0,412
Sem IECA	-1,2 (5,4)		-43 (72,41)	
IBP	-1,09 (6,2)	0,968	-34,53 (84,15)	0,595
Sem IBP	-1,37 (6,1)		-32,17 (87,33)	

Legendas:  $\Delta$ AST: variação da agregometria com sangue total (fase tardia – fase aguda); AA: ácido aracdônico;  $\Delta$ VFN: variação do *VerifyNow*®(fase tardia – fase aguda);  $\geq$ : maior ou igual; <: menor; Glic: glicose; HBg: hemoglobina glicosilada; AI: angina instável; IAMSST: infarto agudo do miocárdio sem supradesnível de ST; IECA: inibidores da enzima de conversão da angiotensina; IBP: inibidores da bomba de prótons; p: valor de p.

#### **4.8 Avaliação da relação entre os testes plaquetários e presença ou não de polimorfismo do receptor plaquetário da glicoproteína IIb/IIIa**

Foi possível obter resultados de genotipagem para 67 pacientes estudados. As frequências genóticas encontradas foram: CC 2,9% (n=2), CT 22,9% (n=16) e TT 70% (n=49). Devido ao pequeno número de indivíduos com o genótipo CC, optamos por agrupar este genótipo ao CT, e comparar essa associação com o genótipo TT. Assim, na **Tabela 18** são apresentadas as características basais dos pacientes de acordo com o grupo genotípico.

Como se pode notar, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos genotípicos em relação às características basais apresentadas na **Tabela 18**.

**Tabela 18 - Características basais dos pacientes na admissão de acordo com o grupo genotípico**

	<b>CT+ CC</b>	<b>TT</b>	<b>Total</b>
Idade em anos (média ± DP)	62 (10)	65 (9)	64,2 ± 9,7
Sexo Feminino (%)	55,6	53,1	54,3
<b>Antecedentes Médicos</b>			
Diabetes (%)	66,7	44,9	48,6
Hipertensão (%)	88,9	85,7	87,1
Dislipidemia (%)	83,3	81,6	82,9
Tabagismo Atual (%)	22,2	10,2	15,7
Obesidade (%)	27,8	22,4	22,9
História Familiar para DAC (%)	33,3	42,9	40
IAM prévio (%)	72,2	53,1	58,6
ATC ou RM prévios (%)	44,4	59,2	54,3
Insuficiência Cardíaca (%)	16,7	6,1	8,6
<b>Diagnóstico na Admissão</b>			
Angina Instável (%)	72,2	79,6	77,1
IAM sem supra de ST (%)	27,8	20,4	22,9
<b>Classificação TIMI de Risco</b>			
0 a 2 (%)	11,2	24,5	21
3 e 4 (%)	61,1	67,4	64
≥ 5 (%)	27,8	8,2	15
<b>Medicações de uso prévio</b>			
AAS (%)	100	100	100
Estatinas (%)	77,8	79,6	80
Inibidores de bomba de prótons (%)	47,1	47,9	47,1
Betabloqueadores (%)	83,3	75,5	78,6
Bloqueadores de Canal de Cálcio (%)	16,7	24,5	15
IECA/BRA (%)	72,2	61,2	64,3
Espironolactona (%)	11,1	2,0	4,3

Legendas: DAC: doença arterial coronariana; ATC: angioplastia transluminal coronariana; RM: cirurgia de revascularização miocárdica; IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina; BRA: bloqueadores do receptor da angiotensina.

Os resultados dos testes plaquetários nas fases aguda e tardia foram então reanalisados, levando-se em consideração agora o grupo genotípico. Assim, foi testada a hipótese de que eventuais diferenças entre as fases aguda e tardia seriam moduladas por diferenças genotípicas.

**Tabela 19 - Testes de agregação plaquetária: comparação entre as fases aguda e tardia de acordo com o grupo genotípico**

Teste	Fase aguda		Fase tardia	
	CT+CC Média (DP)	TT Média (DP)	CT+CC Média (DP)	TT Média (DP)
PFA-100®	203 (83)	218 (85)	198 (85)	195 (84)
AST com AA	4 (5)	3 (5)	1 (3)	2 (4)
VFN®	515 (83)	500 (67)	483 (72)	473 (61)
AST com Col	9 (5)	6 (6)	7 (5)	7 (5)
TXB <sub>2</sub>	11 (21)	6 (14)	12 (21)	3 (6)

Legendas: DP: desvio-padrão; AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; PFA: *platelet function analyzer*®; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p.

**Tabela 20 - Teste estatístico do efeito tempo, genótipo e interação tempo e genótipo**

Teste	P valor efeito de tempo	P valor efeito de genótipo	P valor interação tempo * genótipo
PFA	0,33	0,74	0,51
AST com AA	0,03	0,71	0,21
VFN	0,01	0,28	0,95
AST com Col	0,54	0,40	0,36
TXB <sub>2</sub>	0,72	0,03	0,41

Legendas: AST: agregometria com sangue total; AA: ácido aracdônico; Col: Colágeno; PFA: *platelet function analyzer*®; TXB<sub>2</sub>: tromboxane B<sub>2</sub>; VFN: *VerifyNow*®; p: valor de p.

De acordo com os dados apresentados nas **Tabelas 19 e 20** os testes AST com AA e VFN demonstraram resultados de agregação plaquetária com diferenças estatisticamente significativas entre as fases aguda e tardia ( $p=0,03$  e  $p=0,01$ , respectivamente). No entanto, o grupo genotípico não apresentou influência sobre os resultados dos mesmos testes ( $p=0,71$  e  $p=0,28$ ). Já os resultados do TXB<sub>2</sub> não apresentaram diferenças significativas entre as fases aguda e tardia ( $p=0,72$ ), mas foram diferentes de acordo com o grupo genotípico ( $p=0,03$ ). Os pacientes com os genótipos CT ou CC apresentaram valores significativamente maiores do que os com genótipo TT, tanto na fase aguda quanto na fase tardia



## **5. Discussão**

---

Alguns estudos já haviam demonstrado que o uso prévio de AAS é um fator de risco independente para o desenvolvimento de eventos isquêmicos em pacientes portadores de SIMI sem supradesnível do segmento ST(48, 49). Embora a explicação desse achado ainda não esteja totalmente esclarecida, uma das hipóteses seria a de que esses indivíduos apresentariam AAPR e, portanto, má resposta ao AAS, tornando a medicação menos efetiva. Todavia, não se sabe se a AAPR diagnosticada na fase aguda das SIMI representaria um fenômeno transitório, desaparecendo na fase tardia, ou se seria um estado permanente, independente da fase aguda.

### **5.1 Comparação dos testes plaquetários entre as fases aguda e tardia**

Em estudo publicado em 2005, Hobikoglu e cols.(50) compararam a prevalência de AAPR em uso do AAS em duas populações diferentes (uma de pacientes hospitalizados na fase aguda das SIMI e outra de portadores de DAC crônica). Nesse estudo demonstrou-se, por meio do PFA-100, que a prevalência de AAPR foi maior nos pacientes avaliados durante a fase aguda das SIMI, em relação àqueles avaliados durante a fase crônica (40,3% x 27%, respectivamente,  $p=0,04$ ).

Entretanto, do que seja do nosso conhecimento até o presente momento nenhum estudo testou, numa mesma população, a hipótese de que a AAPR com o uso do AAS poderia ser um fenômeno transitório das SIMI, ocorrendo de forma mais significativa na fase aguda do que na fase tardia.

Tal hipótese foi testada como objetivo principal do presente estudo, demonstrando-se que a AAPR em uso do AAS realmente é mais prevalente na fase aguda das SIMI do que na fase tardia, de acordo com os testes COX-1 específicos (*VerifyNow*: 31,4% x 12,8%,  $p=0,015$ ; e agregometria de sangue total com ácido aracdônico: 32,1% x 16%,  $p= 0,049$ , respectivamente).

Algumas explicações são aventadas para justificar tais achados, algumas testadas de forma pré-especificada como objetivos secundários no presente projeto. Uma primeira explicação seria a presença de uma alta taxa de renovação plaquetária decorrente da fase aguda das SIMI. Como demonstrado em estudos de microangiopatia diabética(42, 43) e em pós-operatório de cirurgia cardíaca(51), pode ocorrer aumento significativo do número de plaquetas imaturas circulantes em decorrência do consumo plaquetário pelo endotélio disfuncional, levando a um aumento exponencial da taxa de renovação plaquetária. Essas plaquetas recém-formadas possuem algumas características que as diferem das plaquetas maduras, como por exemplo maior reatividade e maior concentração de COX-2 e de COX-1 não bloqueada(19). No presente estudo não foi realizada a mensuração da concentração de plaquetas imaturas e, portanto, essa hipótese não pôde ser testada.

Outras explicações para nossos achados poderiam estar relacionadas à carga aterosclerótica, estado inflamatório sistêmico, ou ainda à presença de polimorfismos genéticos, hipóteses estas testadas no presente estudo como objetivos secundários, e que serão discutidas na sequência.

## 5.2 Carga aterosclerótica

No presente estudo 87% dos pacientes foram submetidos à cineangiocoronariografia, que foi utilizada para a estimativa da carga aterosclerótica por meio de três escores angiográficos. Não foi encontrada correlação significativa entre os resultados desses escores e os dos testes plaquetários nessa população.

Da mesma forma, no estudo de Hobikoglu e cols.(50), não foi identificada diferença no resultado dos escores angiográficos de extensão e gravidade entre pacientes considerados portadores de AAPR em uso do AAS e os pacientes com resposta adequada. De forma oposta, Mangiacapra e cols.(52) encontraram correlação significativa entre a AAPR em uso de clopidogrel através do *VerifyNow®* e a carga aterosclerótica medida através da cineangiocoronariografia com diferentes escores angiográficos em pacientes com DAC estável que seriam submetidos à ICP. Adicionalmente, em 2012, Chirumamilla e cols.(53) estudaram a carga aterosclerótica de 335 pacientes que seriam submetidos à ICP, utilizando o ultrassom intracoronário. Nesse estudo foi demonstrada correlação significativa entre a AAPR em uso de clopidogrel, medida pelo *VerifyNow®* e a carga aterosclerótica (extensão e volume da placa).

As diferenças encontradas nesses estudos em relação ao atual podem ser explicadas pelas diferenças metodológicas utilizadas. Em primeiro lugar, a população estudada nos estudos descritos incluiu pacientes com DAC estável, em contraposição à nossa população de pacientes com SIMI. Em segundo lugar, os métodos utilizados para estimativa da carga aterosclerótica foram

diferentes (diferentes escores e a utilização do USIC). Ainda, os dois últimos estudos descritos avaliaram a resposta antiplaquetária ao clopidogrel e não ao AAS. Sendo assim, é possível que, ao se utilizar metodologia de maior acurácia como o USIC, ou mesmo por meio da adição de outros escores angiográficos, poder-se-ia detectar a correlação descrita entre a AAPR em uso de AAS e a carga aterosclerótica em alguns desses estudos, que, todavia, não seria detectada em outros.

### **5.3 Marcadores inflamatórios**

A segunda hipótese testada que poderia explicar os nossos achados foi a de que a variação dos marcadores inflamatórios (fase tardia e fase aguda) poderia se relacionar com a variação dos testes plaquetários. Ou seja, quanto maior a variação dos marcadores inflamatórios maior também seria a variação dos testes plaquetários, inferindo-se que o estado inflamatório da fase aguda da SIMI influenciaria na variação da resposta antiplaquetária ao AAS.

No presente material, esse comportamento foi verificado somente entre a PCR e o VFN, no entanto com uma correlação apenas fraca, apesar de significativa ( $r_s$  0,34,  $p=0,01$ ). De forma inesperada, a IL-6 não apresentou valores estatisticamente diferentes entre as fases aguda e tardia, e tampouco se correlacionou à variação dos testes plaquetários.

Estudos experimentais apontavam para a existência de correlação significativa entre os marcadores inflamatórios e AAPR. Em estudo publicado em 2000, incluindo voluntários saudáveis submetidos a um estado inflamatório

artificial (infusão endovenosa de endotoxina), demonstrou-se o aumento significativo da ativação plaquetária, em relação ao placebo(54). Em 2010, Bernlochner e cols.(55) demonstraram, em estudo retrospectivo, com portadores de DAC estável, que pacientes com PCR elevada apresentavam níveis de agregação plaquetária avaliada por meio da AST com ADP maiores do que pacientes com valores considerados normais da PCR, sendo essa associação independente de outras variáveis. Já em 2005, Ziegler e cols. demonstraram que em pacientes portadores de doença arterial periférica não havia correlação significativa entre a PCR e os resultados do PFA-100(56), em consonância com os nossos achados.

Aqui também as diferenças entre os achados desses estudos podem ser atribuídas às diferenças metodológicas empregadas. Em primeiro lugar, todos os pacientes no nosso estudo eram portadores de SIMI, o que já implica um estado inflamatório sistêmico, bem demonstrado pela diferença encontrada entre os valores da PCR na fase aguda em relação à fase tardia. Em segundo lugar, foram utilizados diferentes testes plaquetários. O estudo de Ziegler, que utilizou o PFA-100, também não encontrou correlação com a PCR, em consonância com os nossos resultados. Já na nossa análise, com o VFN, houve correlação significativa com a PCR, demonstrando a implicação do uso de diferentes testes plaquetários.

A utilização desses marcadores inflamatórios no cenário das SIMI já tem o seu papel prognóstico estabelecido. A correlação, no entanto, com a AAPR nesse mesmo cenário ainda precisa ser mais bem definida. Estudos clínicos adequadamente desenhados para essa finalidade poderão oferecer respostas definitivas.

#### 5.4 Polimorfismo do receptor plaquetário da glicoproteína IIb/IIIa

A terceira explicação para a existência de AAPR em uso do AAS, a qual foi testada nesse estudo, é a presença de polimorfismos genéticos do receptor relacionados ao receptor da GPIIb/IIIa. Nos nossos achados, os diferentes genótipos do receptor não influenciaram os resultados dos testes COX-1 específicos. No entanto, os indivíduos com os genótipos CC ou CT apresentaram níveis de TXB<sub>2</sub> mais elevados, tanto na fase aguda quanto na tardia, em relação aos portadores do genótipo TT.

Esses achados sugerem que esse polimorfismo poderia influenciar a resposta bioquímica do AAS, apesar de não ter influenciado os testes funcionais. Em uma das publicações do projeto Framingham, com 1.422 indivíduos analisados, demonstrou-se que a variabilidade da função plaquetária foi associada ao polimorfismo da GPIIb/IIIa(57). Outro estudo prospectivo, que contou com a inclusão de 1.150 pacientes, demonstrou aumento significativo do risco de estenose pós-*stent* coronariano em pacientes com polimorfismo da GPIIb/IIIa (47% com PLA2 *versus* 38% com PLA1, OR 1,42; p=0,009)(58). Em revisão sistemática conduzida por Goodman T e cols. (59) foi concluído que a presença do polimorfismo do receptor da GPIIb/IIIa está associada à AAPR em uso de AAS, principalmente nos estudos que incluíram voluntários saudáveis. Nos estudos que incluíram pacientes portadores de doenças cardiovasculares essa associação foi menos expressiva, e ainda, variou conforme o teste utilizado para classificar AAPR.

O pequeno número de pacientes incluídos nesse estudo não permitiu a análise isolada de cada uma das frequências genótípicas, o que pode ter subestimado a influência do polimorfismo sobre a agregação plaquetária.

### **5.5. Correlação entre os diferentes testes plaquetários utilizados**

No presente estudo foram realizados cinco diferentes testes plaquetários simultaneamente em pacientes com SIMI, sendo dois considerados COX-1 específicos, dois COX-1 não específicos e um teste bioquímico. O comportamento dos testes específicos diferiu dos demais, na medida em que demonstraram resultados significativamente diferentes entre as fases aguda e crônica, ao contrário dos não específicos.

A correlação encontrada entre os testes plaquetários, tanto na fase aguda quanto na tardia, apesar de estatisticamente significativa, foi de magnitude fraca/moderada. De forma inesperada, mesmo os testes COX-1 específicos apresentaram uma correlação entre si que variou entre fraca e moderada ( $r_s$  0,39,  $p=0,002$  na fase aguda e  $r_s$  0,43,  $p<0,001$ ).

Esses achados estão de acordo com os resultados de estudos anteriores publicados na literatura. Em 2007, Lordkipanidzé e cols.(60) publicaram um estudo com 201 pacientes portadores de DAC estável em uso de AAS. Foram realizados seis testes plaquetários: agregometria óptica (AO) com ácido aracdônico e ADP, AST com AA, PFA-100, *VerifyNow* e dosagem de TXB<sub>2</sub> urinário. A prevalência de AAPR variou de 4% – com a agregometria óptica com AA – a 59,5% com o PFA-100. E, da mesma forma que o estudo



atual, esses autores identificaram uma fraca correlação entre os testes realizados, inclusive entre os testes COX-1 específicos (AO com AA, AST com AA e *VerifyNow*). Já no estudo ASPECT(15), incluindo 125 pacientes com DAC estável em uso de AAS, não foi identificada correlação significativa entre os resultados da AO com AA e os demais testes utilizados (AO com ADP e colágeno, PFA-100, *VerifyNow*, Tromboelastograma, TXB<sub>2</sub> urinário). Da mesma forma, no estudo de Renda G e cols.(61), foram incluídos 77 pacientes em uso crônico de AAS e não foi identificada correlação significativa entre os resultados do PFA, AO com AA e colágeno e com o TXB<sub>2</sub> sérico.

A definição de AAPR em uso de AAS não é uniforme na literatura, sendo que a sua prevalência varia de forma significativa de acordo com o teste plaquetário utilizado. Essa falta de padronização no teste diagnóstico não nos permite conhecer a real prevalência da AAPR em uso de AAS, os seus fatores preditores e o comportamento em diferentes cenários clínicos.

Em 2009 o Grupo de Estudos em trombose da Sociedade Europeia de Cardiologia, em conjunto com a Sociedade Polonesa de Cardiologia Intervencionista, elaboraram um documento com o intuito de uniformizar as definições de AAPR em uso dos antiagregantes(25). Nesse documento propõe-se que para a avaliação da resposta ao AAS os testes que devem ser empregados são os funcionais COX-1 específicos (aqueles que utilizam o AA como agonista), e a dosagem sérica do tromboxane B<sub>2</sub>. No entanto, a dose ideal do AA que deve ser usada e o método que reúne as melhores características (acurácia, facilidade técnica) não foram discutidos.

Na nossa experiência, entre os métodos utilizados (AST com AA, AST com colágeno, *VerifyNow*, PFA-100 e TXB<sub>2</sub> sérico), o *VerifyNow* foi o teste que

reuniu as melhores características: utiliza o AA como agonista; a dose do AA já está padronizada; utiliza sangue total, dispensando a necessidade de preparação do plasma, e apresentou o comportamento esperado (variação significativa entre as fase aguda e crônica).

## **5.6 Análises de subgrupos pré-especificados**

No presente estudo foram analisados nove subgrupos (idade menor ou maior ou igual a 65 anos, sexo masculino ou feminino, tabagismo atual ou não, glicemia menor ou maior ou igual a 126mg/dL, hemoglobina glicosilada menor ou maior ou igual a 6%, apresentação como angina instável ou IAM, uso ou não de estatinas, IECA e IBP) em relação à variação da resposta da fase aguda e tardia dos testes COX-1 específicos. Nenhum desses nove subgrupos apresentou comportamento diferenciado.

Na meta-análise de Krasopoulos G e cols.(35) dois fatores foram considerados preditores de AAPR: sexo feminino e insuficiência renal. No estudo de Lee PY e cols.(62) com pacientes portadores de DAC estável em uso de AAS, utilizando o VFN, foram identificados cinco preditores na análise bivariada: idade avançada, sexo feminino, anemia, insuficiência renal e dose de AAS menor do que 100mg/dia. No modelo ajustado, no entanto, somente anemia e dose de AAS menor do que 100mg/dia permaneceram como preditores de AAPR.

No presente estudo tentamos identificar não apenas preditores da AAPR, mas também subgrupos que poderiam apresentar uma maior variação

dos testes plaquetários da fase aguda em relação à fase crônica. O sexo feminino, apesar de não ter alcançado significância estatística, apresentou uma tendência de maior variação dos testes plaquetários nas diferentes fases, em consonância com os achados prévios. O número de pacientes incluídos pode ter sido insuficiente para detectar essas diferenças esperadas.

### **5.7 Relação entre desfechos clínicos aos três meses de evolução, com níveis de agregação plaquetária**

A incidência de desfechos clínicos nesse estudo foi considerada baixa (10 eventos à custa de angina e/ou reinternação, não havendo óbito, IAM ou necessidade de nova revascularização). Não houve relação entre a incidência do desfecho composto aos três meses e os resultados dos testes plaquetários em resposta ao AAS na fase aguda.

No estudo de Pamukcu e cols(63), realizado em 2006, com 105 pacientes com SIMI com e sem supradesnível de ST, utilizando o PFA-100, 19% dos pacientes apresentavam AAPR. No seguimento de 12 meses, 18% dos pacientes relataram eventos (sendo 13 pacientes com IAM e 6 com angina). A presença de AAPR foi um preditor independente da ocorrência de eventos cardiovasculares maiores aos 12 meses nessa população referida. Nas duas meta-análises(34, 35) já descritas anteriormente, incluindo pacientes com DAC estável, mas também alguns estudos com SIMI, foi demonstrado que pacientes com AAPR em uso do AAS apresentavam risco significativamente maior de eventos cardiovasculares e de mortalidade.

A ausência de associação entre a AAPR em uso de AAS com os desfechos clínicos deve ser interpretada considerando que essa análise não foi o objetivo principal desse estudo e o fato de o tamanho amostral ser insuficiente para essa análise

## **6. Limitações**

---

Os resultados do presente estudo devem ser interpretados considerando o tamanho amostral e as características específicas dessa população de pacientes com SIMI sem supradesnível do segmento ST já em uso de AAS. Entretanto, levando-se em conta o cálculo amostral, a amostra analisada foi suficiente para testar de forma fidedigna a hipótese proposta.

Uma limitação do estudo a ser considerada foi a forma como foi checada a aderência ao uso do AAS, por meio de entrevista direta e checagem do receituário médico, requerendo um maior envolvimento da equipe médica para assegurar a aderência ao tratamento. A dosagem de salicilato sérico ou urinário, apesar de aumentar os custos do projeto, poderia ter facilitado esse processo e até tornado mais confiável a informação, podendo ser incorporada em estudos similares, especialmente aqueles com maior número de pacientes.

Por fim, a mensuração da concentração de plaquetas imaturas, representativa da taxa de renovação plaquetária, poderia ter acrescentado informações relevantes às presentes análises, como já discutido anteriormente. A técnica padrão de mensuração de plaquetas imaturas com citometria de fluxo requer equipamento e treinamento específicos, não disponíveis no nosso serviço durante a realização desse estudo. No entanto, essa seria uma análise complementar, não interferindo no objetivo principal desse estudo.

## **7. Conclusões**

---

O presente estudo mostrou, pela primeira vez em uma mesma população, que a alta atividade plaquetária residual em uso do AAS é mais prevalente na fase aguda das síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis sem supradesnível do segmento ST do que na fase tardia. Esses achados apontam para um fenômeno transitório de hiperreatividade plaquetária e menor resposta ao AAS, atribuíveis a fatores relacionados à fase aguda. As variáveis pré-especificadas analisadas no presente estudo não conseguiram explicar tais achados, sendo necessárias novas pesquisas que visem a um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos.



## **8. Referências Bibliográficas**

1. Stone E. An Account of the Success of the Bark of the Willow in the Cure of Agues. In a Letter to the Right Honourable George Earl of Macclesfield, President of R. S. from the Rev. Mr. Edmund Stone, of Chipping-Norton in Oxfordshire Phil Trans. 1763;53:195-200.
2. O'Brien JR. Effects of salicylates on human platelets. Lancet. 1968;1(7546):779-83.
3. Craven L. Experiences with aspirin (Acetylsalicylic acid) in the nonspecific prophylaxis of coronary thrombosis. Miss Valley Med J 1953;75:38-44.
4. Lewis HD, Jr., Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE, 3rd, et al. 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(7):396-403.
5. Theroux P, Ouimet H, McCans J, Latour JG, Joly P, Levy G, et al. Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina. N Engl J Med. 1988; 319(17):1105-11.
6. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Lancet. 1988; 2(8607):349-60.
7. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. BMJ. 2002; 324(7329):71-86.
8. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. Lancet. 2009; 373(9678):1849-60.

9. Piegas LS FG, Mattos LA, Nicolau JC, Rossi Neto JM, Timerman A Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol* [serial on the Internet]. 2009; 93(6 supl.2): e 179-264.
10. Jneid H, Anderson JL, Wright RS, Adams CD, Bridges CR, Casey DE, Jr., et al. 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/Non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2012; 126(7):875-910.
11. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011; 32(23):2999-3054.
12. Mehta JL, Mohandas B. Aspirin resistance: Fact or fiction? A point of view. *World J Cardiol*. 2010; 2(9):280-8.
13. Roth GJ, Calverley DC. Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood*. 1994; 83(4):885-98.
14. Patrono C, Ciabattoni G, Pinca E, Pugliese F, Castrucci G, De Salvo A, et al. Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B2 production in healthy subjects. *Thromb Res*. 1980 ;17(3-4):317-27.
15. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, et al. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation*. 2007; 115(25):3156-64.

16. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation*. 2003; 108(5):542-7.
17. Mason PJ, Jacobs AK, Freedman JE. Aspirin resistance and atherothrombotic disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005 ; 46(6):986-93.
18. Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M, et al. Platelet-active drugs : the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*. 2001; 119(1 Suppl):39S-63S.
19. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, DeLao T, Bergeron AL, Dong JF, et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost*. 2007; 5(3):490-6.
20. Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, et al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation*. 1995; 91(7):2080-8.
21. Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M. Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart*. 1997; 77(4):333-7.
22. Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 97(8):716-20.
23. Rocca B, Petrucci G. Variability in the responsiveness to low-dose aspirin: pharmacological and disease-related mechanisms. *Thrombosis*. 2012; 2012:376721.
24. Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke*. 2006; 37(8):2153-8.
25. Kuliczowski W, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K, Budaj A, et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance

- appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2009; 30(4):426-35.
26. Borna C, Lazarowski E, van Heusden C, Ohlin H, Erlinge D. Resistance to aspirin is increased by ST-elevation myocardial infarction and correlates with adenosine diphosphate levels. *Thromb J.* 2005; 3:10.
27. Glauser J, Emerman CL, Bhatt DL, Peacock WF. Platelet aspirin resistance in ED patients with suspected acute coronary syndrome. *Am J Emerg Med.* 2010; 28(4):440-4.
28. Nielsen HL, Kristensen SD, Thygesen SS, Mortensen J, Pedersen SB, Grove EL, et al. Aspirin response evaluated by the VerifyNow Aspirin System and light transmission aggregometry. *Thromb Res.* 2008;123(2):267-73.
29. Chakroun T, Addad F, Abderazek F, Ben-Farhat M, Hamdi S, Gamra H, et al. Screening for aspirin resistance in stable coronary artery patients by three different tests. *Thromb Res.* 2007;121(3):413-8.
30. Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J.* 2007; 153(2):175-81.
31. Acikel S, Yildirim A, Aydinalp A, Bal U, Kaynar G, Ozin B, et al. The clinical importance of laboratory-defined aspirin resistance in patients presenting with non-ST elevation acute coronary syndromes. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009; 20(6):427-32.
32. Chen WH, Cheng X, Lee PY, Ng W, Kwok JY, Tse HF, et al. Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2007;120(7):631-5.
33. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial

- infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation*. 2002;105(14):1650-5.
34. Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF. Residual platelet reactivity on aspirin therapy and recurrent cardiovascular events--a meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2008; 128(2):166-71.
35. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008; 336(7637):195-8.
36. Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, et al. Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J*. 2004;147(2):293-300.
37. Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. *Curr Pharm Des*. 2012; 18(11):1478-93.
38. Muhlestein JB. Effect of antiplatelet therapy on inflammatory markers in atherothrombotic patients. *Thromb Haemost*. 2010; 103(1):71-82.
39. Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ. Aspirin resistance and genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis*. 2002; 14(1):51-8.
40. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Ragot S, Allal J, et al. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PIA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalpha) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42(6):1115-9.
41. Pamukcu B, Oflaz H, Nisanci Y. The role of platelet glycoprotein IIIa polymorphism in the high prevalence of in vitro aspirin resistance in patients with intracoronary stent restenosis. *Am Heart J*. 2005; 149(4):675-80.
42. Tschoepe D, Roesen P, Esser J, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Kehrel B, et al. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost*. 1991;17(4):433-8.

43. DiMinno G, Silver MJ, Cerbone AM, Murphy S. Trial of repeated low-dose aspirin in diabetic angiopathy. *Blood*. 1986; 68(4):886-91.
44. Sullivan DR, Marwick TH, Freedman SB. A new method of scoring coronary angiograms to reflect extent of coronary atherosclerosis and improve correlation with major risk factors. *Am Heart J*. 1990; 119(6):1262-7.
45. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36(3):959-69.
46. Killip T, 3rd, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol*. 1967; 20(4):457-64.
47. Hobikoglu GF, Norgaz T, Aksu H, Ozer O, Erturk M, Destegul E, et al. The effect of acetylsalicylic acid resistance on prognosis of patients who have developed acute coronary syndrome during acetylsalicylic acid therapy. *Can J Cardiol*. 2007; 23(3):201-6.
48. Antman EM, McCabe CH, Gurfinkel EP, Turpie AG, Bernink PJ, Salein D, et al. Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Q-wave myocardial infarction. Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 11B trial. *Circulation*. 1999 ;100(15):1593-601.
49. Cohen M, Demers C, Gurfinkel EP, Turpie AG, Fromell GJ, Goodman S, et al. A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for unstable coronary artery disease. Efficacy and Safety of Subcutaneous Enoxaparin in Non-Q-Wave Coronary Events Study Group. *N Engl J Med*. 1997; 337(7):447-52.

50. Hobikoglu GF, Norgaz T, Aksu H, Ozer O, Erturk M, Nurkalem Z, et al. High frequency of aspirin resistance in patients with acute coronary syndrome. *Tohoku J Exp Med.* 2005; 207(1):59-64.
51. Golanski J, Chlopicki S, Golanski R, Gresner P, Iwaszkiewicz A, Watala C. Resistance to aspirin in patients after coronary artery bypass grafting is transient: impact on the monitoring of aspirin antiplatelet therapy. *Ther Drug Monit.* 2005; 27(4):484-90.
52. Mangiacapra F, De Bruyne B, Muller O, Trana C, Ntalianis A, Bartunek J, et al. High residual platelet reactivity after clopidogrel: extent of coronary atherosclerosis and periprocedural myocardial infarction in patients with stable angina undergoing percutaneous coronary intervention. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010; 3(1):35-40.
53. Chirumamilla AP, Maehara A, Mintz GS, Mehran R, Kanwal S, Weisz G, et al. High platelet reactivity on clopidogrel therapy correlates with increased coronary atherosclerosis and calcification: a volumetric intravascular ultrasound study. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2012; 5(5):540-9.
54. Homoncik M, Blann AD, Hollenstein U, Pernerstorfer T, Eichler HG, Jilma B. Systemic inflammation increases shear stress-induced platelet plug formation measured by the PFA-100. *Br J Haematol.* 2000; 111(4):1250-2.
55. Bernlochner I, Steinhubl S, Braun S, Morath T, Jaitner J, Stegherr J, et al. Association between inflammatory biomarkers and platelet aggregation in patients under chronic clopidogrel treatment. *Thromb Haemost.* 2010; 104(6):1193-200.
56. Ziegler S, Alt E, Brunner M, Speiser W, Minar E. Influence of systemic inflammation on the interpretation of response to antiplatelet therapy, monitored by PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 2005; 31(4):416-9.
57. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa



- PIA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(4):1142-7.
58. Kastrati A, Schomig A, Seyfarth M, Koch W, Elezi S, Bottiger C, et al. PIA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement. *Circulation.* 1999; 99(8):1005-10.
59. Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 66(2):222-32.
60. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2007; 28(14):1702-8.
61. Renda G, Zurro M, Malatesta G, Ruggieri B, De Caterina R. Inconsistency of different methods for assessing ex vivo platelet function: relevance for the detection of aspirin resistance. *Haematologica.* 2010; 95(12):2095-101.
62. Lee PY, Chen WH, Ng W, Cheng X, Kwok JY, Tse HF, et al. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2005; 118(7):723-7.
63. Pamukcu B, Oflaz H, Oncul A, Umman B, Mercanoglu F, Ozcan M, et al. The role of aspirin resistance on outcome in patients with acute coronary syndrome and the effect of clopidogrel therapy in the prevention of major cardiovascular events. *J Thromb Thrombolysis.* 2006; 22(2):103-10.