
TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Contagem de Plaquetas
 - ✓ Teste de Função Plaquetária
 - ✓ Teste de Função Plaquetária por Citometria de Fluxo
-

Contagem de Plaquetas: o sangue é misturado a um diluente que causa hemólise das hemácias. O hemocítmetro é preenchido com líquido diluente e as plaquetas são contadas no microscópio, de preferência com contraste de fase, se disponível.

Materiais/equipamentos:

- ✓ Câmara de contagem fina e de fundo plano (hemocítmetro de contraste de fase com marcação Neubauer)
- ✓ Microscópio de contraste de fase equipado com condensador de longa distância de trabalho, se disponível; caso contrário, um microscópio óptico comum
- ✓ Pipeta de 20 µL
- ✓ Pipeta graduada de 2 mL
- ✓ Tubo de 12 x 75 mm
- ✓ Misturador mecânico

Reagente: líquido diluente: oxalato de amônio 1% em água destilada. Mantenha no refrigerador e sempre filtre imediatamente antes de usar.

Amostra: se a amostra de sangue for de picada no dedo, a punção deve estar limpa e o sangue fluindo livremente. Limpe a primeira gota de sangue. Se a amostra de sangue for de sangue venoso, ela deve ser coletada em seringa de plástico seco (ou vidro siliconizado) com agulha curta de calibre não inferior a 21. A agulha deve ser removida antes que o sangue seja transferido para um recipiente plástico com EDTA. O sangue e o anticoagulante devem ser misturados suavemente, para evitar a formação de espuma, sem demora.

Método: pipete 0,38 mL de líquido diluente em um tubo de ensaio. Encha a pipeta de 20 µL até a marca e limpe a parte externa dela. Despeje o conteúdo da pipeta no líquido diluente e lave a pipeta aspirando o sangue e despejando-o no tubo algumas vezes. Misture por pelo menos 10 minutos manualmente ou, de preferência, com um misturador mecânico. Encha o hemocítmetro conforme descrito abaixo. Cubra a câmara com uma placa de Petri por 10 a 20 minutos para permitir que as plaquetas se decantem. Deixe um pedaço de algodão úmido ou papel de filtro na placa para evitar a evaporação. Usando um microscópio, conte as plaquetas nos quadrados grandes de 1 mm (= 0,1 µL). Conte as plaquetas em quantos quadrados forem necessários para atingir uma contagem de pelo menos 100. As plaquetas parecem redondas ou ovais, e sua estrutura granular interna e brilho púrpura permitem que sejam distinguidas de detritos. Hemácias fantasmas que foram lisadas pelo oxalato de amônio são vistas ao fundo. Se o contraste de fase não estiver disponível, um microscópio óptico comum pode ser usado, desde que o condensador seja reduzido para fornecer baixa intensidade de luz. Calcule o número de plaquetas por litro de sangue de acordo com a fórmula abaixo.

Hemocítmetro: a câmara de contagem do hemocítmetro, com marcação Neubauer ou Neubauer aprimorada, é construída de forma que a distância entre a parte inferior da lamínula e a superfície da câmara seja de 0,1 mm. A superfície da câmara contém duas áreas com marcações especiais, com dimensões mostradas na Figura 21. O 1 mm² central possui linhas de contorno duplas ou triplas. Nas áreas centrais, há 25 quadrados na marcação Neubauer

aprimorada e 16 quadrados na marcação Neubauer. Cada quadrado tem uma área de 0,04 mm² (0,2 x 0,2 mm). Esses quadrados são, por sua vez, divididos em quadrados menores, cada um com 0,0025 mm² (0,05 x 0,05 mm). Os quadrantes externos da área demarcada têm 1 mm² cada e são divididos em 16 quadrados.

Cálculos:

A fórmula para calcular a contagem de células é:

$$\text{Contagem (células/L)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

Onde N = número total de células contadas

D = diluição

A = área total contada (em mm²)

10 = fator para calcular o volume em µL a partir da área (em mm²) e da profundidade da câmara (0,1 mm)

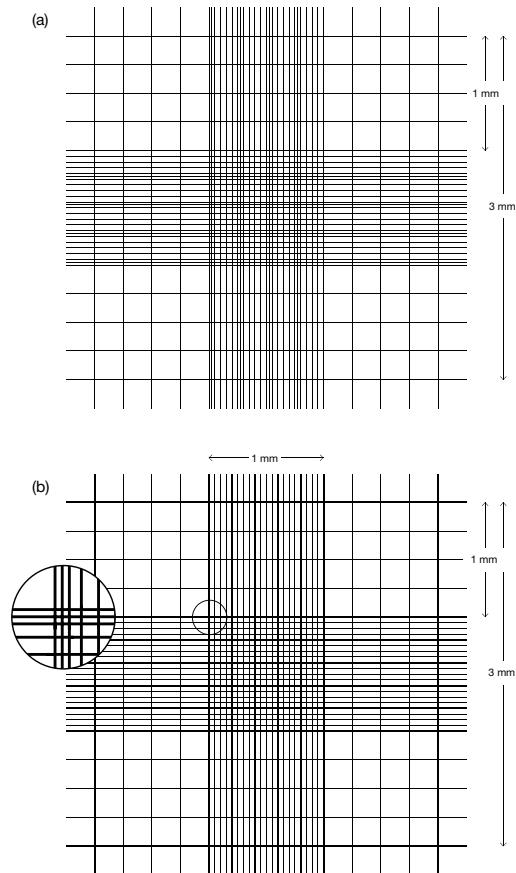
10⁶ = fator para converter contagem/µL em contagem/L

Fontes de erro na contagem de células: quando se utiliza sangue capilar, deve-se obter uma gota fluida. Quando se utiliza sangue anticoagulado, a amostra deve ser cuidadosamente misturada, invertendo o tubo de sangue pelo menos 20 vezes antes da coleta. Não agite o tubo, pois a agitação produz espuma, o que impossibilita a pipetagem exata. Incline o tubo bem misturado em um ângulo de 45° ou um pouco mais e pipete pela borda do tubo, seguindo os mesmos procedimentos usados para o sangue capilar. As pipetas para coleta de sangue devem estar limpas e secas. A pipeta deve ser enchida rapidamente e o sangue deve ser coletado com exatidão, utilizando um dispositivo de sucção acoplado à pipeta, até a linha desejada. Se a linha for ligeiramente ultrapassada, o excesso de sangue pode ser eliminado encostando a borda da pipeta em um pedaço de papel de filtro ou lenço de papel macio. Se a linha for ultrapassada, uma nova pipeta deve ser usada. Não deve haver bolhas de ar na coluna de sangue. A parte externa da pipeta deve ser limpa para remover o sangue (com cuidado para não puxar sangue pela ponta) antes de ser introduzida no líquido diluente. Depois que o conteúdo da pipeta for despejado no diluente, o líquido diluente deve ser aspirado para dentro da pipeta com sucção constante várias vezes, para garantir que todo o sangue seja despejado no líquido. O tubo com o sangue diluído deve ser agitado suavemente por pelo menos dois minutos manualmente ou, de preferência, em um agitador mecânico. Após a agitação do tubo, a câmara é imediatamente preenchida com uma pipeta Pasteur ou tubo capilar. A câmara é preenchida por capilaridade, com o fluxo de líquido da pipeta ou capilar regulado para que preencha de forma rápida e suave. A câmara deve ser preenchida completamente, mas o líquido não deve transbordar para os canais. Deixe as células repousarem na área de contagem por 10 a 20 minutos e, em seguida, prossiga com a contagem. A câmara do hemocitômetro e a tampa de vidro devem estar limpas e secas antes do uso. Erros importantes podem ser causados por impressões digitais ou por uma película oleosa. Um número suficiente de células deve ser contado para reduzir o erro decorrente da distribuição aleatória das células. Na prática, pelo menos 100 células devem ser contadas. Como verificação adicional da distribuição correta das células na câmara, o número de células contadas em cada área (ou seja, nos quadrados grandes) não deve diferir em mais de 10%.

Controles: duas diluições devem ser feitas e a média das duas contagens deve ser obtida; as duas contagens devem concordar em até 10%.

Fontes de erro na contagem de plaquetas: o sangue obtido por punção venosa é preferível ao sangue capilar, pois as plaquetas aderem à ferida e as diluições sucessivas a partir de uma picada no dedo nem sempre são reprodutíveis. Os erros gerais de pipetagem e hemocimetria são descritos acima. Além disso, deve-se prestar atenção especial à limpeza rigorosa da câmara de contagem, pois sujeira e detritos podem ser contados como

plaquetas. Lave a câmara com água e sabão, enxágue com água destilada, deixe escorrer e seque com um pano sem fiapos. Certifique-se de que a lamínula esteja limpa antes de usá-la. A presença de aglomerados de plaquetas impede contagens confiáveis. Se a amostra contiver aglomerados, uma nova amostra deve ser coletada. O diluente de oxalato de amônio deve ser mantido refrigerado e descartado se houver evidência de contaminação bacteriana. A amostra deve ser contada em até três horas após a coleta.



10.2 Teste de Função Plaquetária

10.3 Retração do Coágulo

10.4 Medição da Agregação Plaquetária

Figura 21. Câmara de contagem do hemocitômetro (a) Neubauer e (b) Neubauer aprimorada

Teste de Função Plaquetária: a principal função das plaquetas é auxiliar a hemostasia por meio da formação de um tampão plaquetário nos locais de lesão vascular. Quando o vaso sanguíneo é lesionado e as microfibrilas subendoteliais e as fibras de colágeno são expostas, as plaquetas se ligam à parede do vaso, um processo denominado adesão plaquetária. Em locais de alto cisalhamento, as plaquetas se ligam aos vasos indiretamente com a ajuda de multímeros de FWW de alto peso molecular. O FWW se liga ao colágeno exposto por meio de seu domínio A3, e as plaquetas se ligam ao FWW ligado ao colágeno por meio de seu receptor GPIIb α . As plaquetas também podem aderir diretamente ao colágeno no subendotélio com os receptores de glicoproteína VI (GPVI) e integrina $\alpha 2\beta 1$. Depois de aderirem à parede do vaso, as plaquetas sofrem uma série de alterações: por meio da reorganização do citoesqueleto plaquetário, elas passam de pequenas estruturas em forma de disco para esferas espiculadas com o desenvolvimento de filopódios. A inversão da membrana transloca fosfolípidios aniônicos pró-coagulantes, principalmente fosfatidilserina, para a superfície externa das plaquetas, formando uma boa plataforma para a geração de trombina. As plaquetas liberam o conteúdo de grânulos alfa (por exemplo, fibrinogênio, FV, FWW e fatores de crescimento) e densos (por exemplo, ADP, ATP, cálcio e serotonina). Isso causa mais ativação plaquetária. A formação de tromboxano A2 (TxA₂) ocorre a partir do ácido araquidônico via fosfolipase A2, ciclooxigenase-1 (COX-1) e TxA₂ sintase. Agonistas plaquetários (ADP, TxA₂ e trombina) ligam-se a receptores de membrana específicos e iniciam a agregação plaquetária pela ativação do receptor de integrina $\alpha 2\beta 3$ (GPIIb-IIIa), que se liga ao fibrinogênio e/ou ao FWW para formar o tampão plaquetário. Anormalidades em qualquer uma dessas vias, que causam adesão, ativação, degranulação e agregação plaquetária, podem ocasionar disfunção plaquetária. Os

distúrbios plaquetários incluem defeitos quantitativos (trombocitopenia) ou qualitativos e podem ser hereditários ou adquiridos. Os sintomas de sangramento são principalmente mucocutâneos, como equimoses, sangramento gengival, hematomas frequentes, menorragia, hemorragia pós-parto e sangramento gastrointestinal (melena, hematêmese ou hematoquezia). Os sintomas podem ser leves ou graves, dependendo da anormalidade. Uma lista de distúrbios hereditários da função plaquetária (IPFDs) com características clínicas e laboratoriais relevantes associadas é apresentada na Tabela 33. A prevalência real de distúrbios plaquetários é desconhecida. Acredita-se que os distúrbios da função plaquetária sejam mais comuns do que se imaginava anteriormente devido ao subdiagnóstico. Em áreas do mundo onde a consanguinidade é comum, doenças autossômicas recessivas como trombastenia de Glanzmann e síndrome de Bernard Soulier têm maior prevalência. Embora o diagnóstico de trombastenia de Glanzmann e síndrome de Bernard Soulier seja relativamente fácil devido ao padrão de agregometria típico, o diagnóstico da maioria dos outros IPFDs é complicado e requer exames complexos. Na investigação de pacientes com suspeita de IPFD, é importante coletar histórico clínico detalhado, incluindo histórico pessoal e familiar. O uso de uma BAT validada, como a BAT da ISTH, é fortemente incentivado. O histórico também deve incluir histórico de medicamentos, ingestão alimentar recente que possa interferir na função plaquetária, presença de outras características (por exemplo, eczema, infecções recorrentes, casos familiares de mielodisplasia, LMA) e possíveis características sindrômicas (por exemplo, perda auditiva, defeitos cardíacos, dismorfismo facial ou ósseo, albinismo) que podem auxiliar no diagnóstico. Investigações laboratoriais preliminares devem incluir hemograma completo, incluindo contagem de plaquetas, exame de esfregaço sanguíneo para verificar a morfologia plaquetária e outras características das células sanguíneas (veja abaixo), determinação do tempo de sangramento cutâneo (descrito na Seção 11), testes de triagem para testes hemostáticos secundários (TP e TTPA) e ensaio de fibrinogênio para excluir outros distúrbios de coagulação. Recomenda-se a realização de testes de triagem para DVW (ou seja, atividade do FVW, antígeno do FVW) concomitantemente ou antes de uma investigação mais aprofundada de distúrbios da função plaquetária. DVW, DVW tipo 2B e DVW tipo plaquetária também podem apresentar macrotrombocitopenia e devem ser considerados em pacientes com baixa contagem de plaquetas. Outro teste simples que pode indicar a presença de um defeito na função plaquetária é o método de retração do coágulo, descrito a seguir.

Retração do coágulo: a retração do coágulo no sangue total coagulado pode indicar o número e a função das plaquetas. Quando o coágulo se retrai, o soro é expresso e o grau de retração do coágulo pode ser medido.

Método: colete 1 mL de sangue em um tubo de ensaio de vidro (75 mm x 10 mm) e mantenha a 37°C. Examine o tubo visualmente até a formação de um coágulo firme. Deixe em repouso a 37°C por mais uma hora. Meça a distância da base do tubo ao menisco. Remova cuidadosamente o coágulo com um palito de madeira fino (por exemplo, um palito de coquetel), deixando o soro que foi expresso pelo coágulo no tubo. Meça a distância da base do tubo ao menisco do soro. Divida a distância do soro pela distância total e multiplique por 100 para obter uma porcentagem.

Interpretação: normalmente, mais de 40% do soro é expresso. Expressão reduzida está presente em alguns defeitos plaquetários, notadamente na trombastenia de Glanzmann. Também pode ser anormal em casos de trombocitopenia grave, síndrome de Wiskott Aldrich e síndrome de Stormorken.

Observações: os tubos e o palito de madeira devem estar absolutamente limpos para evitar que o coágulo grude no tubo. O coágulo deve ser removido com cuidado e delicadeza para evitar que seja espremido e, portanto, que mais soro seja expresso.

Contagem de plaquetas, morfologia e exame de esfregaço de sangue periférico: os testes iniciais em caso de suspeita de distúrbio da função plaquetária devem incluir hemograma completo, juntamente com avaliação de esfregaço de sangue periférico. Isso ajuda a detectar anormalidades no número, tamanho e morfologia das plaquetas, o que pode fornecer pistas importantes para exames laboratoriais adicionais. A contagem de plaquetas pode ser medida por método microscópico manual, contagem automatizada em analisadores hematológicos e marcação imunológica por citometria de fluxo. A estimativa da contagem de plaquetas no esfregaço periférico deve ser realizada para confirmar a contagem de plaquetas, especialmente em casos de macrotrombocitopenia ou anisocitose plaquetária. Em um esfregaço bem preparado e corado, o número médio de plaquetas é contado em 10 campos de imersão em óleo (100x). Este valor deve ser multiplicado por 15.000 para determinar a contagem de plaquetas/ μ L. É importante verificar o esfregaço

para avaliar aglomerados plaquetários, tamanho, morfologia e granularidade das plaquetas. Pseudotrombocitopenia causada por aglutinação plaquetária dependente de EDTA e satelitismo (rosetas de plaquetas ao redor de neutrófilos) deve ser descartada. É importante lembrar que aglomerados plaquetários também podem ser observados na DVW tipo plaquetária ou tipo 2B e não devem ser confundidos com aglutinação induzida por EDTA. A DVW tipo plaquetária também pode apresentar plaquetas grandes no esfregaço. Tamanho anormal das plaquetas é frequentemente uma característica de distúrbios plaquetários hereditários (com ou sem disfunção plaquetária), como mostrado abaixo:

- Plaquetas pequenas: síndrome de Wiskott-Aldrich, trombocitopenia ligada ao X, deficiência de ADAP
- Plaquetas grandes/gigantes: síndrome de Bernard Soulier (gigantes), distúrbios relacionados a MYH9 (gigantes), síndrome das plaquetas cinzentas e síndromes de deficiência de grânulos α , DVW tipo plaquetária, trombocitopenia relacionada a ITGA2B/ITGB3 (variante GT), filaminopatia, trombocitopenia relacionada a SLFN14, defeitos de GATA1, síndrome velocardiofacial
- Plaquetas normais: Todos os demais distúrbios

O volume plaquetário médio (VPM) é um parâmetro prontamente disponível em analisadores hematológicos de contagem de plaquetas por impedância e fornece uma estimativa do tamanho das plaquetas. Os laboratórios devem estabelecer suas próprias faixas de referência, pois o VPM pode variar entre os instrumentos. Plaquetas pequenas podem facilmente passar despercebidas na microscopia óptica e VPM reduzido pode ser o primeiro indício de possível síndrome de Wiskott-Aldrich. Vários fatores podem afetar a medição do VPM e interferir na contagem de plaquetas por impedância, como anormalidades em hemácias e plaquetas. A presença de hemácias microcíticas e fragmentadas pode superestimar a contagem de plaquetas, enquanto a presença de plaquetas grandes e/ou gigantes pode não ser detectada, causando subestimação da contagem de plaquetas. Nesses cenários, a contagem de plaquetas e o VPM não serão confiáveis. É muito útil observar concomitantemente o histograma plaquetário que consegue identificar anormalidades no tamanho das plaquetas e possíveis interferências/contaminação. Na macrotrombocitopenia, contagens ópticas ou fluorescentes de plaquetas fornecem contagens plaquetárias mais precisas. Plaquetas grandes e pálidas com citoplasma cinza-azulado e grânulos azurófilos ausentes ou acentuadamente reduzidos podem ser observadas na síndrome das plaquetas cinzentas devido a deficiência de grânulos α . A síndrome de Paris-Trousseau apresenta plaquetas grandes a gigantes, algumas delas com grânulos α aglomerados/fundidos, formando um único grânulo grande e aglomerado. Anisocitose plaquetária (ou seja, variação no tamanho das plaquetas) e "anisogranularity" (ou seja, variação na granularidade das plaquetas), com presença de plaquetas pálidas e com aspecto vazio, são características clássicas da disfunção plaquetária adquirida com eosinofilia (APDE). APDE é uma diátese hemorrágica transitória associada à eosinofilia, comumente presente em crianças do Sudeste Asiático e revertida com o tratamento da eosinofilia. Anormalidades morfológicas também podem ser observadas em outras células sanguíneas. Presença de corpos de inclusão semelhantes aos de Dohle nos neutrófilos em distúrbios relacionados a MYH9, grânulos citoplasmáticos gigantes peroxidase-positivos em neutrófilos e/ou outros leucócitos na síndrome de Chediak Higashi, corpos de Howell Jolly na síndrome de Stormoken e diseritropoiese em mutações no gene GATA-1.

Medição da agregação plaquetária por agregometria de transmissão de luz: agregometria de transmissão de luz (LTA) é o padrão ouro para testes de função plaquetária. Foi descrita pela primeira vez de forma independente por O'Brien e Born na década de 1960. O princípio se baseia nas alterações na densidade óptica do plasma rico em plaquetas (PRP) à medida que as plaquetas são ativadas e formam agregados. O PRP é turvo devido à suspensão de plaquetas em comparação ao PPP. Depois que agonistas são adicionados ao PRP, as plaquetas formam agregados e se depositam, limpando o plasma e permitindo a passagem de mais luz. A alteração na luz transmitida é medida ao longo do tempo por um agregômetro e representada graficamente. Ao comparar o padrão de resposta de agregação a cada agonista, o tipo de distúrbio da função plaquetária pode ser suspeitado e diagnosticado. Várias excelentes revisões e diretrizes para testes de função plaquetária e diagnóstico de IPFDs foram publicadas.

Precauções antes do estudo de agregação plaquetária (variáveis pré-analíticas na agregação plaquetária): amostras de sangue para LTA devem ser coletadas após um curto período de repouso. Os indivíduos não devem fumar pelo menos 30 minutos antes nem ingerir cafeína pelo menos 2 horas antes do teste. Um registro de todos os medicamentos, incluindo medicamentos nativos/fitoterápicos, administrados nos últimos 10 dias deve ser documentado. Para obter uma lista de medicamentos que podem interferir na função plaquetária, consulte as diretrizes da *British Society for Haematology* sobre testes de função plaquetária mencionados abaixo. Medicamentos que sabidamente inibem de maneira reversível a função plaquetária (por exemplo, AINEs) devem ser interrompidos pelo menos 3 dias antes da coleta. Medicamentos

que sabidamente inibem de maneira irreversível a função plaquetária (por exemplo, aspirina, tienopiridinas) devem ser interrompidos pelo menos 10 dias antes da coleta, a menos que seu efeito esteja sendo especificamente investigado. O ideal é que os pacientes estejam em jejum, de preferência após o período noturno. Caso contrário, evite coletar amostras após refeições gordurosas. Muitos outros ingredientes "normais" da dieta, incluindo álcool, cebola, alho, pimenta e gengibre, também podem inibir a agregação plaquetária. Isso deve ser levado em consideração ao avaliar os resultados. O sangue deve ser coletado com venostase mínima ou inexistente, utilizando uma agulha de calibre 21, no mínimo, em anticoagulante tamponado com citrato de sódio 109 mM ou 129 mM. Os primeiros 3-4 mL de sangue coletados devem ser descartados ou utilizados para outros testes que não a LTA (por exemplo, TP/TTPA). Quando a coleta da amostra for difícil, tubos subpreenchidos podem ser utilizados apenas para descartar defeitos graves da função plaquetária, como trombostenia de Glanzmann ou síndrome de Bernard-Soulier.

Preparação de plasma rico em plaquetas e pobre em plaquetas: as amostras de sangue devem ser deixadas em repouso em temperatura ambiente por pelo menos 15 minutos antes da centrifugação. A refrigeração das plaquetas pode causar ativação e, portanto, as amostras devem ser sempre mantidas em temperatura ambiente. O PRP deve ser preparado centrifugando as amostras de sangue a 200 g por 10 minutos em temperatura ambiente (~21 °C) sem o uso de freio. Para amostras com plaquetas muito grandes, como na síndrome de Bernard-Soulier, o PRP deve ser preparado por sedimentação sanguínea por 30 minutos. O PRP é cuidadosamente removido, evitando contaminação com hemácias ou com a camada leucocitária (a agregação será diminuída se qualquer uma delas estiver presente), em um tubo de polipropileno tampado, mantido na vertical a 20–25°C. O PPP deve ser preparado centrifugando o sangue total, ou os tubos de sangue dos quais o PRP foi removido, em temperatura ambiente a 1500 g por 15 minutos. Amostras muito hemolisadas devem ser rejeitadas. Se a amostra for lipêmica, indique isso no relatório final. É necessário verificar a contagem de plaquetas do PRP. Os resultados dos estudos de LTA podem ser inexatos quando a contagem de plaquetas na amostra de PRP for menor que $150 \times 10^9/L$. Amostras com baixa contagem de plaquetas devem ser interpretadas com cautela, mas podem ser testadas para excluir distúrbios graves da função plaquetária, como trombostenia de Glanzmann, síndrome de Bernard Soulier, DVW tipo 2B e DVW plaquetária. A contagem de plaquetas das amostras de PRP NÃO deve ser ajustada para um valor padronizado com PPP autólogo. A contagem de plaquetas no PRP em amostras de indivíduos com contagem plaquetária normal ($200\text{--}600 \times 10^9/L$) não afeta os resultados dos estudos de LTA. Ajustar a contagem de plaquetas no PRP usando PPP autólogo dentro dessa faixa pode inibir a responsividade plaquetária. Isso provavelmente ocorre porque o PPP pode conter substâncias liberadas das plaquetas durante o trauma adicional da centrifugação em alta velocidade usada na preparação do PPP. Permanece a incerteza sobre qual é a melhor prática a ser seguida quando a contagem de plaquetas no PRP excede $600 \times 10^9/L$. No caso de contagens extremamente altas no PRP ($>1000 \times 10^9/L$), pode ser vantajoso ajustar a contagem plaquetária para um nível mais adequado ao PPP do paciente.

Agentes agregantes ou agonistas: existem dois tipos de agonistas: agonistas fracos e potentes. Agonistas fracos (por exemplo, ADP e epinefrina) em concentrações críticas exibem uma onda primária inicial de agregação devido ao efeito direto induzido pelo agonista, seguida por uma onda secundária de agregação causada pela liberação de grânulos plaquetários e síntese de TXA_2 . Agonistas potentes (por exemplo, trombina, colágeno, TXA_2), por outro lado, exibem apenas uma única curva, sem distinção entre agregação primária e secundária, visto que esses agonistas induzem diretamente a agregação plaquetária, a síntese de TXA_2 e a liberação de grânulos. As diferentes fases da agregação plaquetária são mostradas na Figura 22, que é evidente apenas com agonistas fracos.

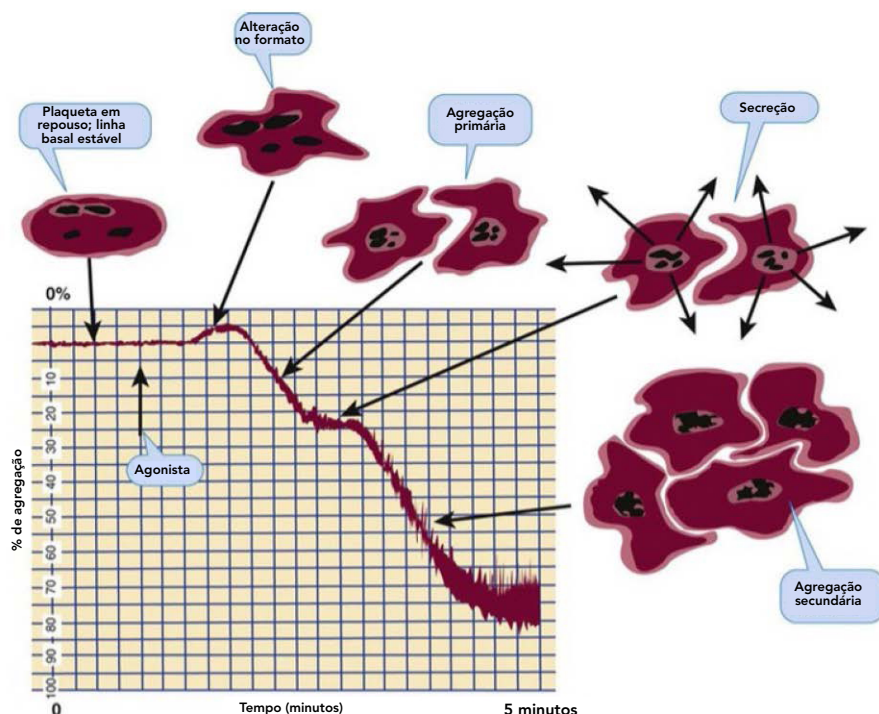


Figura 22. Imagem de Rodak's Hematology: Clinical principles and applications, 5th edition

Tabela 33. Resumo dos agonistas recomendados juntamente com as concentrações que podem ser usadas como painel inicial e painel estendido (concentrações segundo as diretrizes da ISTH)

Agonista	Painel inicial e concentração	Painel estendido e concentração
ADP*	2 μ M	5 μ M, 10 μ M
Epinefrina*	5 μ M	10 μ M
Colágeno (Horm ou tipo 1 fibrilar)	2 μ g/mL	
Ácido araquidônico	1 mM	
Ristocetina (dose baixa)	0,5-0,7 mg/mL	
Ristocetina (dose alta)	1,2-1,5 mg/mL	
Peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP)*, PAR1	-	10 μ M
U46619 mimético do tromboxano A2	-	1 μ M

*Concentrações mais altas devem ser usadas se resultados anormais forem observados com a concentração inicial.

Adenosina-5-difosfato (ADP): uma solução estoque de 1 mM/L do sal dissódico é preparada em OBS e armazenada em pequenas quantidades a -40°C . Essa solução permanece estável por pelo menos três meses. Depois de descongelada, a solução deve ser usada em até três horas ou descartada. Para uso, diluições adicionais são preparadas em OBS. O padrão de resposta ao ADP depende de sua concentração final. A 2 μ mol/L, ondas primárias e secundárias claramente definidas podem ser observadas: a primeira representa o efeito direto induzido pelo agonista e a segunda é causada pela liberação de ADP endógeno e geração de TXA_2 , que por sua vez agrega plaquetas. Abaixo de 2 μ mol/L, cada vez menos indivíduos normais apresentam uma resposta secundária, e a onda primária geralmente é revertida à medida que o ADP é degradado enzimaticamente. Acima de 3 μ mol/L, a fase primária costuma ser tão intensa que a distinção entre ela e a fase secundária é mascarada. O ADP induz uma alteração no formato das plaquetas, de disco para esfera pontiaguda. Isso causa inicialmente discreto aumento na densidade óptica da suspensão plaquetária, que só pode ser observado se a agregação primária estiver prejudicada.

Adrenalina (epinefrina): uma solução estoque de 1 mM/L do sal de bitartarato é preparada em OBS. Deve ser armazenada e usada da mesma forma que a de ADP. Com a adrenalina, as concentrações utilizadas e os padrões de resposta são semelhantes aos do ADP. Porém, na ausência de uma onda secundária, a onda primária não é revertida, nem é tão intensa a ponto de mascarar a onda secundária.

Colágeno: uma suspensão muito estável de fibrilas de colágeno de tendão equino (1 mg/mL), disponível na Hormon-Chemie, Munique, Alemanha, é amplamente utilizada. Diversos outros materiais são igualmente adequados. É armazenada a 4°C e deve ser bem misturada imediatamente antes da diluição no tampão que a acompanha. Deve ser usada na concentração final de 0,5–2,0 µg/mL em PRP, e as suspensões diluídas permanecem estáveis por uma semana a 4°C. Com o colágeno, não ocorre onda primária. A resposta é geralmente definida pela duração da fase de latência anterior ao início da agregação e pela intensidade desta última. Discreto aumento na densidade óptica causado pela alteração no formato precede a agregação. Colágeno de diversas fontes é utilizado. O tipo de colágeno e a espécie a partir da qual a preparação é feita (por exemplo, equino ou bovino) podem ter um efeito importante nos resultados obtidos. De fato, são necessárias concentrações mais de cem vezes maiores, dependendo do material de origem. Portanto, é importante selecionar uma fonte adequada e estabelecer uma faixa de referência local para esse material, que deve ser reavaliada caso a fonte seja alterada. Para uma revisão, consulte Jennings et al. (2008).

Ristocetina: em uma concentração final de ristocetina de 1 mg/mL em PRP, ondas primárias e secundárias distintas são geralmente discerníveis, mas acima disso o efeito direto é tão intenso que as duas fases se fundem. A onda primária é uma medida da quantidade de FVW presente no plasma, enquanto a segunda onda é causada pela liberação de substâncias endógenas.

Ácido araquidônico: araquidonato de sódio (99% de pureza) é dissolvido em OBS a uma concentração de 10 mM/L. Pequenas alíquotas são colocadas em frascos de vidro escuro, que são lavados com nitrogênio para evitar oxidação, hermeticamente fechados e armazenados congelados abaixo de -20°C. A agregação é geralmente monofásica e precedida por uma curta fase de latência.

Reagentes: alguns exemplos de concentrações e diluições de reagentes são mostrados abaixo.

Observação: essas concentrações são apropriadas se uma parte for adicionada a nove partes de PRP. As diluições podem ser feitas em água destilada ou solução salina, ou conforme as instruções do fabricante.

- ✓ ADP (Solução estoque 1000 µM)

Faça uma diluição de 1:10 = 100 µM (ou seja, 0,1 mL de solução de 10.000 µM + 0,9 mL de OBS). A partir disso, faça as concentrações de trabalho apropriadas: 20 µM (ou seja, 0,2 mL de 100 µM + 0,8 mL de OBS), concentração final de PRP de 2-50 µM (ou seja, 0,5 mL de 100 µM + 0,5 mL de OBS), concentração final de PRP de 5 µM. Nos casos em que a hiperagregabilidade estiver sendo testada, concentrações de trabalho mais baixas podem ser necessárias (por exemplo, 10 µM, 5 µM).

- ✓ **Adrenalina (epinefrina):** dilua igual ao ADP para fazer uma concentração de trabalho de 50 µM. Isso resultará em uma concentração final de PRP de 5 µM.
- ✓ **Colágeno:** misture bem e dilua em OBS/outros diluentes: 1:500 (ou seja, 0,1 mL de estoque + 4,9 mL de OBS) = 20 µg/mL, concentração final de PRP de 2 µg/mL.
- ✓ **Ristocetina:** é usada em até duas concentrações diferentes, dependendo dos resultados obtidos. Dose normal de ristocetina de 15 mg/mL ou 12,5 mg/mL, e dose baixa de ristocetina de 7,5 mg/mL ou 5 mg/mL. Isso resultará em uma concentração final de PRP de 1,5 mg/mL ou 1,25 mg/mL e dose baixa de ristocetina de 0,75 mg/mL ou 0,5 mg/mL, respectivamente, dependendo da concentração utilizada.

Método/procedimento: os estudos de LTA devem ser concluídos em no máximo 4 horas após a coleta de sangue. Em razão da refratariedade das plaquetas à agregação após a centrifugação, as amostras de PRP devem ser deixadas em temperatura ambiente por pelo menos 15 minutos antes do teste. O PRP deve ser armazenado em tubos cheios e hermeticamente fechados até o momento do teste. Antes de iniciar, deixe os reagentes/agonistas atingirem a temperatura ambiente. Prepare novas diluições dos reagentes, se necessário. Ligue o agregômetro e o computador/

gravador e aguarde até que a temperatura do agregômetro atinja 37°C. Ajuste a velocidade de agitação para 1000 rpm, a menos que especificado de outra forma pelo fabricante do agregômetro. Pipete 450 µL de PRP em uma cubeta de vidro com barra de agitação magnética. O número de cubetas usadas depende do número de agonistas a serem testados. Pré-aqueça as cubetas de PRP nos poços de incubação ao redor do bloco aquecedor por 2-5 minutos. Pipete 500 µL de PPP em outra cubeta de vidro sem barra de agitação e coloque no poço de referência do branco correspondente. PRP e PPP autólogo devem ser usados para definir 0% e 100% de transmissão de luz no agregômetro. Deixe funcionar por 1 minuto antes de adicionar o agonista. Pipete 50 µL de agonista no fundo da cubeta de PRP sem produzir bolhas. O volume de agonista adicionado para LTA deve ser consistente e nunca acima de 10% do volume total da amostra. Uma amostra de controle conhecida deve ser analisada paralelamente à do paciente. A agregação plaquetária deve ser monitorada por no mínimo 3 minutos após a adição de um agonista e por até 10 minutos para agonistas que não atingirem a agregação máxima em 3-5 minutos. Repita o procedimento para cada agonista.

Observações: se uma resposta anormal for observada com o painel inicial de agonistas, um painel estendido adicional (Tabela 35) pode ser adicionado juntamente com liberação de ATP por lumiagregometria (veja abaixo). Concentrações mais altas de agonistas (por exemplo, ADP, epinefrina) devem ser usadas se uma resposta anormal for observada na concentração inicial. Se nenhuma resposta de agregação for observada com o ácido araquidônico, adicione o agonista, análogo do receptor de TXA₂ (TRA), U46619. Em defeitos na síntese de TXA₂ (deficiência da COX/TXA₂ sintase) ou efeito da aspirina, resposta normal é observada com TRA. Em casos de defeito do receptor de TXA₂, respostas anormais são observadas tanto com ácido araquidônico quanto com TRA. Resposta anormal isolada com epinefrina pode ser observada em uma proporção de indivíduos saudáveis. No entanto, essa pode ser a única característica de distúrbio plaquetário de Quebec na LTA. Ao estudar a agregação plaquetária como parte de uma avaliação de hiperagregabilidade, ADP e adrenalina são usados em concentrações mais baixas para obter uma curva de dose-resposta. As concentrações usadas são: 2 µM, 1 µM, 0,5 µM e 0,1 µM de concentração final em PRP. Agregação espontânea também é realizada antes que o restante dos agonistas sejam testados. Se as plaquetas se hiperagregarem com 0,5 mg/mL de ristocetina, isso indica possível DVW tipo 2B ou DVW tipo plaquetária. Verifique se há agregação espontânea monitorando o PRP nas mesmas condições de agitação do agregômetro, sem adicionar nenhum agonista para estimular a agregação. Realize estudos de mistura para diferenciar os dois subtipos. Isso pode ser feito por dois métodos. Procedimento básico: misture volumes iguais de plasma de paciente com plaquetas normais (ou seja, 225 µL de PPP de paciente + 225 µL de PRP de controle). Essa mistura é então testada com ristocetina a 0,5 mg/mL. A presença de aglutinação sugere DVW tipo 2B. A ausência de aglutinação pode ser causada por DVW tipo plaquetária. É importante observar que a ausência de resposta também pode ser devido a diluição adicional de PRP.

Procedimento alternativo: lave as plaquetas de paciente e controle três vezes com PBS-EDTA em tubos de centrífuga de 15 mL (baixa velocidade de centrifugação para peletizar as plaquetas). Ressuspenda cuidadosamente as plaquetas de paciente no plasma normal e as plaquetas normais no plasma de paciente. Ajuste a contagem de plaquetas para 400 x 10⁶ plaquetas peletizadas (observe que PBS-EDTA é preparado adicionando EDTA dissódico 9 mM à PBS e ajustando o pH para 7,0. A PBS utilizada contém NaCl 135 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 8 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM, com pH de 7,4.) Reteste com ristocetina a 0,5 mg/mL. As reações devem se encaixar em um dos padrões abaixo.

Tabela 34. Interpretação de DVW tipo 2B e DVW tipo plaquetária

Tubo 1	Plaquetas de paciente lavadas + PPP de controle	Sem aglutinação	Aglutinação
Tubo 2	Plaquetas de controle lavadas + PPP de paciente	Aglutinação	Sem aglutinação
	INTERPRETAÇÃO	DVW tipo 2B	DVW tipo plaquetária

As diretrizes para DVW de 2021 favorecem o uso de testes genéticos direcionados no diagnóstico de DVW tipo 2B e tipo plaquetária. Contudo, isso pode não ser viável para muitos laboratórios devido a restrições de custo. O estudo de mistura com RIPA ainda é mantido como um dos testes no algoritmo diagnóstico, de acordo com a ISTH.

Interpretação e relato dos resultados: o traçado da agregação plaquetária deve ser avaliado com base na presença de alteração no formato, duração da fase de latência (alguns agonistas, como o colágeno, podem ter uma fase de latência mais longa), agregação máxima (método mais conveniente e comumente utilizado para relato dos resultados), inclinação da agregação (indica a taxa de agregação), exame visual dos traçados de agregação (ou seja, desagregação,

presença de onda secundária — particularmente distinta para epinefrina e baixas doses de ADP). A desagregação com ADP é particularmente marcante em defeitos hereditários do P2Y₁₂. O PRP preparado da mesma forma a partir de um doador normal sadio deve ser processado e analisado simultaneamente com o de paciente como verificação dos reagentes. Isso é especialmente importante se forem obtidos resultados anormais do paciente, pois alguns agonistas são lábeis, particularmente depois de diluídos até concentrações de trabalho. Os laboratórios clínicos devem estabelecer intervalos de referência apropriados para a concentração de cada agonista. Resultados de indivíduos normais sadios testados juntamente com o paciente podem ser usados para obter as faixas de referência. É necessária muita cautela ao interpretar os padrões de agregação plaquetária. Vários fatores técnicos podem influenciar os resultados. Tenha em mente que há uma série de diferenças importantes entre a agregação determinada por nefelometria e aquela que ocorre no corpo. No entanto, informações úteis para o diagnóstico podem ser obtidas, e alguns exemplos de padrões de agregação são mostrados na Tabela 35.

Tabela 35. Resultados de agregação plaquetária em vários distúrbios

Distúrbio	ADP	Colágeno	Ristocetina 1,25 mg/mL	Ristocetina 0,5 mg/mL	Ácido araquidônico	Adrenalina
DVW tipo 1 e 2A	N	N	A/R**	A	N	N
DVW tipo 2B	N	N	N	H	N	N
Síndrome de Bernard-Soulier	N	N	A	A	N	N
Trombastenia de Glanzmann	A	A	N	A	A	A
Doença do pool de armazenamento	P/N	R/N	N	A	R/N	P/N
Defeito da ciclooxygenase*	R/N	R	N	A	R/A	R/N

N = Normal; A = Ausente; R = Reduzida; H = Resposta elevada; P = Apenas onda primária

*Ou efeito da aspirina

**Pode ser normal na DVW tipo 1 leve

Investigação adicional da função plaquetária: se um padrão de agregação anormal for observado em um indivíduo, é aconselhável repetir a avaliação em pelo menos mais uma ocasião para verificar a consistência da anormalidade. Na presença de agregação anormal, investigações adicionais podem ser úteis. Estas incluem a medição do conteúdo dos nucleotídeos plaquetários e sua liberação durante a agregação plaquetária. A quantificação de glicoproteínas de membrana pode ser realizada para o diagnóstico inequívoco de síndrome de Bernard-Soulier e trombastenia de Glanzmann (veja abaixo).

Liberação de ATP por lumiagregometria: lumiagregometria é o método mais amplamente utilizado para avaliar a função de liberação dos grânulos densos das plaquetas. Tem a vantagem de que LTA e liberação de ATP dos grânulos densos podem ser medidas simultaneamente. Baseia-se no princípio da reação luciferina-luciferase. Quando as plaquetas são ativadas, os grânulos densos liberam o ATP e o ADP armazenados. O ATP liberado reage com a luciferina na presença de luciferase, produzindo luminescência que pode ser quantificada em relação a um padrão de ATP. Secreção defeituosa de ATP pode ser observada tanto na deficiência de grânulos densos quanto em defeitos de secreção primária. A distinção entre as duas entidades requer testes adicionais, como medição do teor total de ATP-ADP nas plaquetas por ensaios bioluminescentes, ensaios de liberação de serotonina com ¹⁴C-5-HT radiomarcado, ensaio de mepacrina por citometria de fluxo (veja abaixo) ou avaliação de grânulos densos por microscopia eletrônica de transmissão de montagem completa.

Tabela 36. Fatores técnicos que influenciam a função plaquetária

Anticoagulante	1/10 do volume de citrato trissódico.
Tempo	Iniciar os testes 30 minutos após a preparação do PRP. Concluir os estudos em até quatro horas após a coleta de sangue.
Centrifugação	Deve ser suficiente para remover hemácias e leucócitos, mas não plaquetas grandes. Deve ser realizada em temperatura ambiente, não a 4°C. Plaquetas grandes podem ser separadas por sedimentação.
Contagem de plaquetas	Contagens baixas $<100 \times 10^9/L$ causam respostas lentas e fracas. Contagens altas $>1000 \times 10^9/L$ podem apresentar resposta reduzida.
pH	$<pH\ 7,7$ inibe a agregação. $>pH\ 8,0$ aumenta a agregação.
Velocidade de mistura	$<800\ rpm$ mostra agregação reduzida. $>1200\ rpm$ desfaz aglomerados de plaquetas.
Hematócrito	$>55\%$ mostra progressivamente menos agregação, especialmente inibição da segunda fase devido ao aumento da concentração de citrato.
Temperatura	$<35^\circ C$ mostra diminuição da agregação com doses regulares de todos os agonistas, mas aumento da resposta a baixas doses de ADP.
Lipemia	O aumento de quilomícrons causa agregação reduzida.
Cubeta suja	Pode causar agregação espontânea aparente
Sem barra de agitação	Nenhuma resposta na adição de agente agregante.
Bolhas de ar	Oscilações rápidas e amplas da caneta antes da agregação. Também causadas por baixa contagem de plaquetas.

Diferenças entre condições de agregação plaquetária in vivo e in vitro: nos exames de sangue *in vitro*, o sangue é anticoagulado, os glóbulos vermelhos e brancos são removidos, os componentes vasculares não estão envolvidos, a coagulação não está envolvida, a população de plaquetas é selecionada, os produtos de ativação e liberação plaquetária são mantidos, os reagentes usados são não fisiológicos na composição e dosagem, as plaquetas são instáveis fora do corpo e os medicamentos podem apresentar efeitos mais ou menos acentuados do que in vivo.

Teste de Função Plaquetária por Citometria de Fluxo: a citometria de fluxo pode fornecer informações úteis para o diagnóstico e a classificação de distúrbios da função plaquetária. Pode ser utilizada para análise de receptores de glicoproteínas, teste de função plaquetária após estimulação com agonista, medição da função pró-coagulante das plaquetas (por exemplo, ligação à anexina V) e avaliação do conteúdo de grânulos alfa e densos. As principais vantagens da citometria de fluxo são a necessidade de pequenos volumes de amostra, ela pode ser realizada em sangue total e não é limitada por trombocitopenia. Isso se torna particularmente útil em pacientes pediátricos e trombocitopênicos.

Análise de glicoproteínas de superfície plaquetária por citometria de fluxo: a trombastenia de Glanzmann, caracterizada por $\alpha IIb\beta 3$ anormal ou ausente, pode ser detectada com anticorpos monoclonais anti-GPIIb (CD41) ou CDIIIa (CD61) marcados com fluorescência, e a síndrome de Bernard Soulier, caracterizada por GPIb/V/IX anormal ou ausente, pode ser diagnosticada com anticorpos direcionados contra GPIb (CD42b) ou GPIX (CD42a). Além disso, outros IPFDs menos comuns que afetam os receptores $\alpha 2\beta 1$ (CD49/CD29), GPIV (CD36) ou GPVI também podem ser diagnosticados com os respectivos anticorpos. A análise de moléculas de superfície pode ser feita até 24 horas após a coleta. Teste de ativação plaquetária (PACT) por citometria de fluxo. O PACT permite a medição simultânea de uma ampla gama de diferentes marcadores de ativação da função plaquetária, permitindo assim uma análise mais abrangente de várias vias envolvidas na função plaquetária. As plaquetas podem ser identificadas por meio de suas propriedades características de dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral (SSC) e, preferivelmente, pela adição de um receptor de glicoproteína específico (por exemplo, CD41). Alguns dos marcadores de ativação comumente usados são: PAC-1 (anticorpo monoclonal que se liga especificamente à forma conformacional ativada de $\alpha IIb\beta 3$), CD62P ou P-selectina (um dos conteúdos dos grânulos α , pode ser usado como marcador de liberação

de grânulos α) e CD63 (pode ser usado como marcador de liberação de grânulos δ). O teste pode ser realizado utilizando uma combinação de agonistas que visam diferentes vias, como ADP, peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) e convulxina. A expressão dos marcadores de ativação nas plaquetas é medida (usando MFI e/ou %) na linha basal (antes da adição do agonista) e após a estimulação com agonista. Expressão reduzida após estimulação com agonista sugere defeito/anormalidade na via específica. É importante analisar uma amostra de controle simultaneamente, da mesma forma que na LTA.

Ligação do FVW induzida por ristocetina por citometria de fluxo: a função do receptor GP1b/V/IX e do FVW também pode ser avaliada por citometria de fluxo, medindo a expressão de FVW nas plaquetas após a adição de doses normais e baixas de ristocetina. Anticorpo monoclonal anti-FVW pode ser utilizado. Estudos de mistura com plasma de paciente e plasma de controle, e vice-versa, com baixas doses de ristocetina, conseguem diferenciar a DVW tipo 2B e a DVW tipo plaquetária.

Ensaio de captação e liberação de mepacrina por citometria de fluxo: o ensaio de captação e liberação de mepacrina também pode ser usado para avaliar defeitos nos grânulos δ . A mepacrina é um derivado fluorescente da acridina que se liga aos nucleotídeos de adenosina plaquetária com alta afinidade. Após incubação das plaquetas com mepacrina a 37°C por 30 minutos, ela é captada seletivamente pelos grânulos densos, o que pode ser medido pelo aumento da fluorescência por citometria de fluxo. A função de liberação também pode ser avaliada medindo a fluorescência da mepacrina após estimulação com agonista (por exemplo, convulxina ou TRAP). A fluorescência é medida na linha basal (apenas plaquetas), após a adição de mepacrina (plaquetas + mepacrina) e após a adição do agonista (plaquetas + mepacrina + agonista). As razões de captação e liberação podem ser calculadas. Captação e liberação diminuídas são observadas na deficiência de grânulos densos, enquanto captação normal com liberação reduzida é observada em defeitos de secreção.

Atividade pró-coagulante das plaquetas: após estimulação simultânea de plaquetas com convulxina e trombina, um subconjunto de plaquetas expressa o fosfolípido aniônico pró-coagulante fosfatidilserina na superfície das plaquetas ativadas. Isso pode ser avaliado usando anexina V ou lactaderina marcada com fluorescência, que se liga à fosfatidilserina. A translocação de fosfolípidios pró-coagulantes facilita a montagem de fatores de coagulação para geração de trombina na superfície das plaquetas. A citometria de fluxo permite a detecção de atividade pró-coagulante comprometida (síndrome de Scott) ou aumentada (síndrome de Stormoken) e suas síndromes associadas.

Tabela 37a. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Defeitos dos receptores de glicoproteínas					
Trombastenia de Glanzmann	ITGA2B, ITGB3	Normal	Resposta ausente a todos os agonistas, exceto aglutinação à ristocetina	Citometria de fluxo identifica deficiência de GPIIb/GPIIIa	Autossômico recessivo, sangramento grave
Trombocitopenia relacionada a ITGA2B/ITGB3	ITGA2B, ITGB3	Macrotrombocitopenia com anisocitose	Resposta ausente/comprometida a todos os agonistas, exceto aglutinação à ristocetina	Expressão reduzida de GPIIb/GPIIIa Expressão defeituosa de PAC1	Autossômico dominante, sangramento leve a moderado
Síndrome de Bernard Soulier	GP1BA, GP1BB, GP9	Macrotrombocitopenia	Resposta ausente de aglutinação à ristocetina	Citometria de fluxo identifica deficiência de GP1b-IX-V	Autossômico recessivo, sangramento moderado/ grave
Síndrome de DiGeorge/velocardiofacial/síndrome de deleção 22q11.2	Del22q11.2	Contagens de plaquetas normais/ discretamente reduzidas com plaquetas grandes	Agregação normal/ variável (resposta reduzida à ristocetina em ~30% dos casos)	Expressão reduzida de GP1b/IX/V por citometria de fluxo	Fenda palatina, defeitos cardíacos, fâcies anormal, deficiências de desenvolvimento, imunodeficiência, sangramento leve a significativo
DVW tipo plaquetária	Mutação de ganho de função no GP1BA	Macrotrombocitopenia, aglomerados de plaquetas	Aumento da aglutinação com baixa concentração de ristocetina	Multímeros de FVW de alto peso molecular reduzidos (atividade do FVW reduzida)	Autossômico dominante, sangramento leve a moderado
Defeitos dos receptores de colágeno	GP6 ND	Normal	Resposta isolada de agregação reduzida ao colágeno	Deficiência de GPVI ou $\alpha 2\beta 1$ por citometria de fluxo	Autossômico recessivo, sangramento leve

Tabela 37b. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Anormalidades dos receptores acoplados à proteína G					
Defeito do receptor de TXA ₂ (TP)	TBXA2R	Normal	Agregação anormal com AA e análogo de TXA ₂ (U46619)		Autossômico recessivo, diátese hemorrágica leve
Defeito do receptor de ADP (P2Y12)	P2Y12	Normal	Resposta de agregação acentuadamente prejudicada ao ADP (apenas onda primária); resposta reduzida com outros agonistas também pode ser observada	Diminuição da expressão de marcadores de ativação na estimulação com agonista por ADP	Autossômico recessivo, sangramento leve após trauma/cirurgia
Defeitos dos grânulos plaquetários (isolados/sindrômicos)					
Defeitos dos grânulos alfa					
Síndrome das plaquetas cinzentas	NBEAL2	Macrotrombocitopenia; plaquetas grandes com citoplasma cinza-azulado e grânulos azurófilos ausentes	Variável, anormalidades leves; pode ser normal	Grânulos α ausentes/ reduzidos por ME Expressão de P-selectina reduzida/ ausente por citometria de fluxo/ELISA	Autossômico recessivo; sangramento leve, mielofibrose progressiva com esplenomegalia
Artrogripose renal colestática (ARC)	VPS33B, VIPAS39	Plaquetas cinzentas grandes	Variável, anormalidades leves; pode ser normal	Grânulos α ausentes/ reduzidos por ME P-selectina está reduzida em alguns e normal em outros	Contraturas em flexão, hipotonia, icterícia colestática, acidose tubular renal, déficit de crescimento, ictiose, infecção, diátese hemorrágica leve
Síndrome de Paris-Trousseau/Jacobsen	Del11q23 incluindo FL1	Plaquetas grandes, poucas com grânulos α fundidos	Variável	Grânulos α gigantes fundidos na ME, dismegacariopoiese	Diátese hemorrágica leve, atraso no desenvolvimento, defeitos cardíacos, anomalias craniofaciais

Tabela 37c. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Defeitos dos grânulos densos					
Deficiência de grânulos densos isolada/ deficiência de pool de armazenamento δ		Normal	Variável. Pode ser reduzida a vários agonistas: ADP, colágeno e epinefrina, ou normal	Diminuição da liberação de ATP por lumiagre-gometria Redução do ADP plaquetário e aumento da relação ATP/ADP	
Síndrome de Hermansky-Pudlak	HPS1, AP3B1 (HPS2), HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DNTBP1 (HPS7), BLOC1S3 (HPS8) e BLOC1S6 (HPS9)	Normal	Variável	Grânulos densos reduzidos/ ausentes por TEM de montagem completa Redução de CD63 e redução da captação e liberação de mepacrina por citometria de fluxo	Albinismo oculocutâneo, imunodeficiência, diátese hemorrágica leve, fibrose pulmonar, colite granulomatosa e neutropenia.
Trombocitopenia relacionada a SLFN14	SLFN14	Macrotrombocitopenia	Variável		
Síndrome de Chediak-Higashi	LYST	Grânulos citoplasmáticos gigantes peroxidase-positivos em leucócitos; linfocitose	Variável		Albinismo oculocutâneo variável, infecções recorrentes de risco à vida, diátese hemorrágica leve
Distúrbios combinados de grânulos α/ grânulos δ	ND	Plaquetas cinzentas pálidas por microscopia de luz	Variável	Grânulos α e δ ausentes/ reduzidos na TEM e outras características observadas em distúrbios de grânulos alfa e densos	Diátese hemorrágica leve a moderada
Defeito de secreção de grânulos ou defeito de secreção primária	ND	Normal	Variável	Diminuição da liberação de ATP por lumiagre-gometria, captação normal de mepacrina com liberação reduzida de mepacrina por citometria de fluxo Redução da expressão de CD63 por citometria de fluxo; grânulos alfa e densos normais por ME	Diátese hemorrágica leve a moderada

Tabela 37d. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Defeitos dos fatores de transcrição					
Distúrbios plaquetários familiares com malignidade mieloide associada (FPD/LMA)	RUNX1	Trombocitopenia	Agregação anormal a múltiplos agonistas	Defeito de secreção de grânulos δ	Predisposição para desenvolver SMD e LMA
Defeito dos grânulos δ relacionado a FLI1	FLI1	Trombocitopenia	Agregação reduzida a colágeno e TRAP	Defeito de secreção de grânulos δ	
Defeito de GATA1	GATA1	Macrotrombocitopenia	Agregação reduzida a colágeno e ristocetina	Conteúdo e liberação reduzidos de grânulos α	
Defeito relacionado a GFI1B	GFI1B	Macrotrombocitopenia, diseritropoiese	Normal	Liberação reduzida de grânulos α	Autossômico dominante
Defeitos das proteínas de transdução de sinal					
Defeito da fosfolipase A2 citosólica/ Deficiência de ciclooxigenase/ Deficiência de TXA ₂ sintase	PLA2G4A/ ND/ TBXAS1	Normal	Resposta ausente com AA e resposta normal com TXA ₂		
Defeito da CalDAG-GEFI	RASGRP2	Normal	Resposta acentuadamente reduzida/ ausente a ADP, epinefrina, resposta reduzida/ normal a colágeno, TRAP e ristocetina	Expressão normal de GPIIb/GPIIIa Expressão defeituosa de PAC1	Autossômico recessivo, sangramento grave
Deficiência de adesão leucocitária tipo III	FERMT3	Leucocitose	Padrão tipo GT	Expressão normal de GPIIb/GPIIIa Expressão defeituosa de PAC1	Autossômico recessivo, infecção bacteriana grave, má cicatrização de feridas, sangramento grave

Tabela 37e. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Defeitos das proteínas do citoesqueleto					
Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS)/ trombocitopenia ligada ao X	WAS	Microtrombocitopenia		Diminuição de subconjuntos de células T, função das células natural killer, diminuição de grânulos α e δ por TEM	WAS: herança ligada ao X; eczema, imunodeficiência, malignidades e autoimunidade
Doença relacionada a MYH9 (anteriormente conhecida como síndromes de Sebastian, May-Hegglin, Fechtner e Epstein)	MYH9	Macrotrombocitopenia, corpos de inclusão semelhantes aos de Dohle nos neutrófilos	Normal		Autossômico dominante; associação variável com perda auditiva neurossensorial, catarata e nefrite
Defeito de ADAP	FYB	Microtrombocitopenia		Expressão aumentada de P-selectina e PAC-1, mas expressão prejudicada após ativação	
Defeitos dos fosfolípidios de membrana					
Síndrome de Scott	TMEM16F	Normal	Normal	Ligação à anexina reduzida por citometria de fluxo	Autossômico recessivo
Síndrome de Stormorken	STIM1, ORAI1	Anemia, corpos de Howell Jolly	Normal	Ligação à anexina V aumentada e expressão defeituosa de PAC-1	Dismorfismo facial, ictiose, miopatia
Atividade fibrinolítica plaquetária aumentada					
Distúrbio plaquetário de Quebec	PLAU (duplicação)	Variável trombocitopenia	Resposta anormal com epinefrina	Excesso de ativador do plasminogênio do tipo uroquinase nas plaquetas causando proteólise de proteínas dos grânulos α e fibrinólise	Autossômico dominante, sangramento de início tardio após cirurgia/trauma, ausência de resposta a antifibrinolíticos, mas responsivo a antifibrinolíticos

Referências

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135(5): 603-633.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- The British Society for Haematology Haemostasis and Thrombosis Task Force. Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol* 1988; 41(12): 1322-1330.
- Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, Lecompte T, Latger-Cannard V. Usefulness of flow cytometric mepacrine uptake/release combined with CD63 assay in diagnosis of patients with suspected platelet dense granule disorder. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42(3): 282-291.

- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: A consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013; 11(6): 1183-1189.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2009; 7(6): 1029.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: Autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92(5): 694-697.
- Chanarin I (ed). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989.
- Dave RG, Geevar T, Chellaiya GK, Mammen JJ, Vijayan R, Samuel A, Gowri M, Nair SC. Stability and utility of flow cytometric platelet activation tests: A modality to bridge the gap between diagnostic demand and supply. *Platelets* 2022; 33(7): 1043-1051.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30(2): 91-94.
- Frontroth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 473-494.
- Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.
- Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13(2): 314-322.
- Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, Falcinelli E. Platelet function assays in diagnosis: An update. *Expert Rev Hematol* 2019; 12(1): 29-46.
- Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *Int J Lab Hematol* 2018; 40 Suppl 1: 34-45.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61(8): 950-954.
- Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M. Advances in platelet function testing-light transmission aggregometry and beyond. *J Clin Med* 2020; 9(8): 2636.
- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost* 2008; 6(4): 677-683.
- Rand ML, Reddy EC, Israels SJ. Laboratory diagnosis of inherited platelet function disorders. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(4): 485-493.
- van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G, Huisman A, Korpelaar SJA, Urbanus RT. Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 689-698.