

## Ativação plaquetária em diferentes formas de apresentação da doença arterial coronária: importância da P-Selectina e outros marcadores nas anginas estável e instável

### Platelet activation in different clinical forms of the coronary artery disease: roll of -Selectin and others platelet markers in the stable and unstable angina\*

Alexandre de Matos Soeiro<sup>(1)</sup>, Leila Fernandes Araujo<sup>(2)</sup>,  
Margareth L. Venturinelli<sup>(3)</sup>, Carlos Vicente Serrano Júnior<sup>(4)</sup>

Soeiro AM, Araujo LF, Venturinelli ML, Serrano Júnior CV. Ativação plaquetária em diferentes formas de apresentação da Doença Arterial Coronária: importância da P-Selectina e outros marcadores nas anginas estável e instável. Rev Med (São Paulo). 2006 jan.-mar.;85(1):16-21.

**RESUMO:** OBJETIVO: Os marcadores da ativação plaquetária estão geralmente elevados na doença arterial coronária. Desse modo, procuramos identificar a presença e as potenciais associações de diferentes marcadores da ativação plaquetária. MÉTODOS: Nós estudamos pacientes com angina instável (n = 28), pacientes com angina estável (n = 36) e pacientes sem doença arterial coronária (n = 30); sexo e idade foram estratificados. Os níveis sanguíneos da molécula de adesão P-selectina, do thromboxane B2 e de serotonina foram medidos por imunoenaios enzimáticos. RESULTADOS: Quando nós comparamos os grupos, os resultados foram: a P-selectina, o thromboxane B2 e os níveis do serotonina apresentaram-se significativamente mais elevados nos pacientes com angina instável do que nos pacientes com angina estável. CONCLUSÃO: Estes marcadores da ativação plaquetária podem, portanto, identificar formas instáveis de doença arterial coronária.

**DESCRITORES:** Ativação plaquetária; Coronariopatia/patologia; Selectina-P/análise; Marcadores biológicos/análise; Angina estável.

---

Prêmio Oswaldo Cruz – Área Clínica. COMU 2005

<sup>(1)</sup> Acadêmico do 6º ano do Curso de Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

<sup>(2)</sup> Acadêmico do 4º ano do Curso de Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

<sup>(3)</sup> Doutora da Unidade de Coronariopatia Aguda do Incor.

<sup>(4)</sup> Professor Doutor. Assistente da Unidade de coronariopatia aguda do Incor.

**Endereço para correspondência:** Alexandre de Matos Soeiro. Rua Maranhão, 690, ap.81, Bairro Santa Paula, São Caetano do Sul – SP. CEP: 09545-001. E-mail: alexandre.soeiro@bol.com.br

## INTRODUÇÃO

A doença arterial coronária (DAC) é uma das afecções mais prevalentes na atualidade e suas complicações trombóticas são responsáveis por um crescente número de mortes e incapacitações. Nos últimos anos, estudos experimentais, concomitantemente à observações clínicas e patológicas trouxeram um melhor conhecimento sobre como a trombogênese ocorre e sua real incidência na DAC<sup>21</sup>.

As plaquetas têm sido reconhecidos como sendo um fator iniciador e também propagador da trombose coronária<sup>4,7,19,25-28,30</sup>. No local de ruptura da placa, as plaquetas aderem-se formando uma camada inicial e a partir desse ponto, uma variedade de fatores ativadores (colágeno, adenosina difosfato [ADP], adrenalina, serotonina) promovem a ativação plaquetária<sup>4,7,19,25-28,30</sup>.

Nesse contexto, a agregação plaquetária e a formação do trombo secundária à ruptura da placa são implicadas como os principais mecanismos patogênicos envolvidos na angina instável. A fisiopatologia da angina instável é diferente da angina induzida por esforço devido ao aumento da demanda miocárdica de oxigênio<sup>8</sup>. O processo envolvido na angina instável tem sido amplamente estudado e ampliado em trabalhos recentes<sup>6,8,9,11,13,15,17</sup>. A angina instável parece envolver a formação de um trombo transitório mediado por uma cascata complexa de interações celulares entre o endotélio vascular e plaquetas<sup>17</sup>.

As moléculas de adesão celular funcionam como uma “chave” nas interações celulares, acarretando o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo a trombose coronária, aterosclerose, reestenose após angioplastia coronária, e lesão de reperfusão<sup>13,17,31</sup>. Nesse meio, destaca-se a P-selectina, um membro da família das selectinas e uma glicoproteína de membrana encontrada em plaquetas e em células endoteliais, responsável em grande parte pela ativação e agregação plaquetárias<sup>13,31</sup>. Após a ativação celular por agonistas como a trombina, a P-selectina é rapidamente redistribuída na superfície das células, iniciando vias de sinalização para neutrófilos e monócitos. Portanto, a P-selectina é capaz de mediar interações entre plaquetas, leucócitos e endotélio<sup>1,5,31</sup>.

Neste estudo, nós analisamos os níveis plasmáticos de P-selectina solúvel, serotonina e tromboxano B2

em pacientes com angina instável ou angina estável com o objetivo de ampliar o conhecimento da fisiopatologia destas duas síndromes distintas.

## MÉTODOS

### Casuística

A população em estudo consistiu de um grupo de pacientes com angina instável (n = 28), um grupo de pacientes com angina estável (n = 36) com indicação de revascularização coronária e um grupo controle sem DAC (n = 30). Informações clínicas detalhadas e específicas, como história de angina “pectoris”, fatores de risco para DAC, medicações em uso, e intervenções coronárias prévias foram prospectivamente coletadas. Todos os pacientes foram incluídos somente após lerem e assinarem o termo de consentimento esclarecido. Pacientes com infecções presentes, diabetes mellitus, neoplasias, doença hepática crônica, insuficiência renal, doenças do tecido conectivo, ou sendo tratadas com anti-coagulantes (clopidogrel, aspirina, ou inibidores do receptor da glicoproteína IIb/IIIa) ou anti-inflamatórios, foram excluídos do estudo. Pacientes receberam tratamento medicamentoso convencional para angina instável ou angina estável. Todos os pacientes estavam aguardando cirurgia de revascularização miocárdica sem o uso de aspirina, o que evita sua interação com a ativação plaquetária. Quando anticoagulação era indicada com heparina em pacientes com angina instável, nós selecionamos somente pacientes em uso de heparina de baixo peso molecular, que não altera a função plaquetária. O perfil clínico dos pacientes é apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características da população estudada nos três grupos distintos.

Características da amostra	Angina estável n = 36	Angina instável n = 28	Grupo controle n = 30
Idade (média ± D.P.)	56,9 ± 9,1	57,8 ± 12,3	56,2 ± 8,7
Homens/mulheres (n)	30/6	25/3	23/7
Dislipidemia (n)	18	14	13
Tabagismo (n)	10	14	8
HAS (n)	14	11	11
Sedentarismo (n)	24	25	22
Obesidade (n)	18	18	15
História familiar de DAC (n)	10	10	8
IAM prévio (n)	22	8	0
História prévia de revascularização miocárdica cirúrgica e/ou angioplastia coronária percutânea (n)	18	4	0

Abreviações: HAS = hipertensão arterial sistêmica; DAC = doença arterial coronária; IAM = infarto agudo do miocárdio.

### Grupo angina instável

Pacientes admitidos no departamento de emergência com dor anginosa típica e depressão do segmento ST no eletrocardiograma receberam o diagnóstico de angina instável. De um grupo de 48 pacientes inicialmente selecionados, 20 pacientes com elevação dos níveis séricos das enzimas CK-MB e/ou troponina I foram excluídos. Do restante (25 homens e 3 mulheres), todos tinham estenose > 75% do diâmetro luminal, em pelo menos uma artéria coronária.

### Grupo angina estável

Os 30 homens e as 6 mulheres incluídos no grupo angina estável tinham dor anginosa típica ao esforço físico, ausência de dor ao repouso, teste ergométrico positivo, e estenose > 75% do diâmetro luminal, em pelo menos uma artéria coronária.

### Grupo controle

Incluiu 23 homens e 7 mulheres sem evidências de DAC.

### Coleta das amostras sanguíneas e análise dos marcadores plaquetários

Em pacientes com angina instável, as amostras de sangue venoso foram coletadas imediatamente após sua admissão ao departamento de emergência, antes do início da terapia de anticoagulação. Em pacientes com angina estável, as amostras sanguíneas foram coletadas antes da angiografia. Todas as amostras foram obtidas de uma veia antecubital. As amostras anticoaguladas foram separadas e estocadas a -80°C para posterior análise dos marcadores plaquetários. Concentrações de P-selectina solúvel, serotonina e tromboxano B2 foram mensuradas no plasma estocado através da utilização de "kits" de imunensaio enzimático (Bender MedSystems Diagnostic GmbH, Immunotech/Coulter and Amersham Pharmacia, respectivamente).

### Análise estatística

Os níveis plasmáticos de P-selectina solúvel, serotonina e tromboxano B2 foram comparados por ANOVA com utilização do programa de computador SYSTAT 9. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

### P-selectina solúvel

Os níveis plasmáticos de P-selectina solúvel (Figura 1) no grupo angina instável foram  $274,2 \pm 131,90$  ng/mL, no grupo angina estável foram  $199,7 \pm 15,78$  ng/ml e no grupo controle foram  $176,20 \pm 43,90$  ng/dL. Esses resultados são significativamente maiores no grupo angina instável do que no grupo angina estável ou grupo controle ( $P < 0,002$ ).

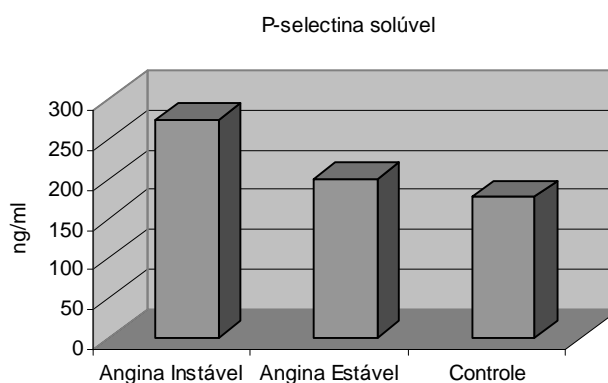


Figura 1. Comparação dos níveis plasmáticos de P-selectina solúvel nos três grupos estudados.

### Tromboxano B2

Os níveis plasmáticos de tromboxano B2 (Figura 2) no grupo angina instável foram  $62,89 \pm 14,58$  pg/mL, no grupo angina estável foram  $21,03 \pm 6,44$  pg/ml e no grupo controle foram  $19,09 \pm 3,28$  pg/dL. Os níveis de tromboxano B2 foram significativamente maiores no grupo angina instável do que no grupo angina estável ou grupo controle ( $P < 0,001$ ).

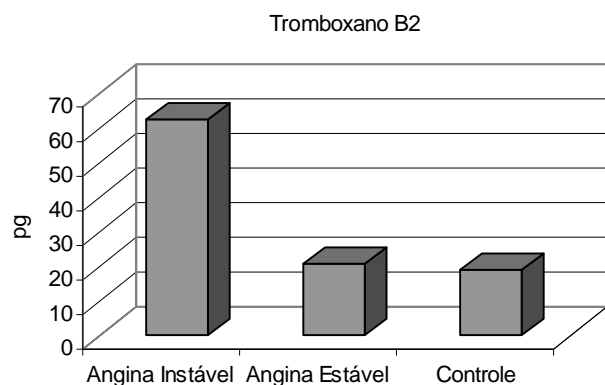
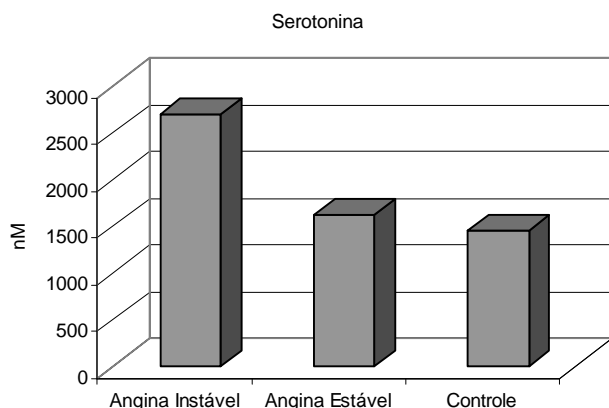


Figura 2. Comparação dos níveis plasmáticos de tromboxano B2 nos três grupos estudados.

## Serotonina

Os níveis plasmáticos de serotonina (Figura 3) no grupo angina instável foram  $2692,61 \pm 358,42$  nM, no grupo angina estável foram  $1631,36 \pm 315,20$  nM e no grupo controle foram  $1462,20 \pm 166,36$  nM. Os níveis de serotonina foram significativamente maiores no grupo angina instável do que no grupo angina estável ou grupo controle ( $P < 0,001$ ).



**Figura 3.** Comparação dos níveis plasmáticos de serotonina nos três grupos estudados.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos níveis plasmáticos de P-selectina solúvel, tromboxano B2 e serotonina foram maiores em pacientes com angina instável do que em pacientes com angina estável. Isso corrobora o fato da ativação plaquetária assumir extrema importância na circulação sanguínea durante uma síndrome coronária aguda.

**P-selectina solúvel:** A ruptura da placa coronária resulta na formação de um trombo sendo que a agregação plaquetária é considerada o principal mecanismo responsável pelo desenvolvimento de síndromes coronárias agudas, incluindo a angina instável<sup>5</sup>. Estudos recentes<sup>2,3,5</sup> têm demonstrado que o aumento nos níveis plasmáticos de P-selectina solúvel em pacientes com angina instável pode ser devido à ruptura da placa e formação do trombo, assim como à interação entre plaquetas e leucócitos ativadas antes da ruptura da placa. Desse modo, a P-selectina solúvel poderia ser usada como um marcador de instabilização da placa aterosclerótica<sup>10</sup>. Além disso, o nível de P-selectina em pacientes com doença multiarterial coronária poderia ser maior do que em pacientes com doença em apenas um único vaso<sup>12</sup>. Em conclusão, a P-selectina solúvel pode indiretamente refletir a condição clínica de pacientes com DAC, com potenciais implicações diagnósticas e terapêuticas<sup>10,12,14,20,24</sup>.

Ault et al.<sup>3</sup> demonstraram que há evidências de ativação plaquetária contínua após um evento coronário agudo. A P-selectina seria um método sensível de mensurar a ativação plaquetária. Ela permaneceria elevada por aproximadamente um mês após a estabilização clínica do paciente que apresentou angina instável ou infarto agudo do miocárdio. A persistência da ativação plaquetária deve ser uma consequência do estímulo inflamatório mantido<sup>2,3</sup>. Os autores também encontraram uma estreita relação entre a ativação plaquetária e os níveis de proteína C reativa sérica<sup>3</sup>.

**Tromboxano B2:** Os níveis de tromboxano B2 foram estimados através da medida de 11-dihidrotromboxano B2, o metabólito enzimático mais abundante do tromboxano B2 no plasma. Este estudo demonstrou aumento dos níveis de tromboxano em pacientes com angina instável quando comparado com angina estável. Estes achados são consistentes com o conceito de que a angina estável reflete um fluxo sanguíneo reduzido através de uma estenose fixa e com a observação de que os inibidores do tromboxano A2 e seus antagonistas não alteram a isquemia miocárdica induzida pelo exercício<sup>22</sup>. Estes achados também sugerem que o aumento do tromboxano B2 na angina instável provavelmente é um evento de importância primária na isquemia miocárdica, o que é refletido pela redução em 30 a 50% de infarto agudo do miocárdio em pacientes que usam aspirina<sup>3,22</sup>.

**Serotonina:** Estudos clínicos<sup>29,32,34</sup> têm demonstrado que as plaquetas após serem ativadas, agregam-se em locais de estenose arterial coronária e lesão endotelial. As plaquetas ativadas liberam serotonina em quantidades substanciais causando vasoconstrição e agregações plaquetárias recorrentes, com conseqüentes reduções de fluxo sanguíneo. A serotonina também age como um fator de crescimento estimulando a ocorrência de mitoses em células musculares lisas arteriais<sup>23</sup>. Trabalhos recentes propuseram que a serotonina seria útil como um marcador de doença vascular aterosclerótica<sup>16,18,33</sup>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que P-selectina solúvel, tromboxano B2 e serotonina estão aumentados em pacientes com angina instável quando comparados à angina estável. Esperamos que estes marcadores de ativação plaquetária possam auxiliar no esclarecimento da fisiopatologia da angina instável, e possam indiretamente refletir a condição clínica de pacientes com DAC, com potencial implicação diagnóstica e terapêutica.

Soeiro AM, Araujo LF, Venturinelli ML, Serrano Júnior CV. Platelet activation in different clinical forms of the coronary artery disease: roll of -selectin and others platelet markers in the stable and unstable angina. Rev Med (São Paulo). 2006 jan.-mar.;85(1):16-21.

**ABSTRACT:** PURPOSE: Markers of platelet activation are elevated in coronary artery disease. We sought to identify the presence and the potential associations of different markers of platelet activation. METHODS: We studied patients with unstable angina (n = 28), patients with stable angina (n = 36) and patients without coronary artery disease (n = 30); sex and age matched. Blood levels of the adhesion molecule P-selectin, Thromboxane B2 and Serotonin were measured by enzyme immunoassays. RESULTS: When we compared the groups the results were: sP-selectin, thromboxane B2 and serotonin levels were significantly higher in patients with unstable angina than in patients with stable angina. CONCLUSION: These markers of platelet activation were able to identify unstable forms of coronary artery disease.

**KEYWORDS:** Platelet activation; Coronary disease/pathology; P-Selectin/analysis; Biological markes/analysis; angina, unstable.

## REFERÊNCIAS

1. Atalar E, Aytemir K, Haznedaroglu Y, Ozer N, Ovunc K, Aksoyek S, et al. Increased plasma levels of soluble selectins in patients with unstable angina. *Int J Cardiol.* 2001;78:69-73.
2. Atalar E, Haznedaroglu Y, Aytemir K, Ozer N, Aksoyek S, Ovunc K, et al. Circulating adhesion molecules in patients with stable coronary artery disease. *Int J Hematol.* 2000;72(4):507-11.
3. Ault AK, Cannon CP, Mitchell J, McCahan J, Tracy RP, Novotny WF, et al. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33(3):634-9.
4. Azar RR, Waters D. The inflammatory etiology of unstable angina. *Am Heart J.* 1996;132:1101-6.
5. Blann AD, Lip GYH. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis.* 1997;128:135-138.
6. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GpIIb/IIIa dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), avb3 integrin, and Gplba. *J Exp Med.* 1998;187:329-39.
7. Collier BS. Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Annu Rev Med.* 1992;43:171-80.
8. Collier BS. Diagnostic and therapeutic applications of antiplatelet monoclonal antibodies. *Biorheology.* 1987;24:649-58.
9. Collier BS. Inhibitors of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor as conjunctive therapy for coronary artery thrombolysis. *Coron Artery Dis.* 1992;3:1016-29.
10. Draz N, Hamdy MS, Gomaa Y, Ramzy AA. Soluble P-selectin is a marker of plaque destabilization in unstable angina. *Egypt J Immunol.* 2003;10(1):83-7.
11. Einsenberg PR. Mechanism of action of heparin and anticoagulant therapy: implications for the prevention of arterial thrombosis and the treatment of mural thrombosis. *Coron Artery Dis.* 1990;1:159-5.
12. Fang L, Wei H, Mak KH, Xiong Z, Song J, Wang D et al. Markers of low-grade inflammation and soluble cell adhesion molecules in Chinese patients with coronary artery disease. *Can J Cardiol.* 2004;20(14):1433-8.
13. Fitzgerald D, Roy L, Catella F, Fitzgerald G. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Eng J Med.* 1986;315:983-9.
14. Guray U, Erbay AR, Guray Y, Yilmaz MB, Boyaci AA, Sasmaz H, et al. Levels of soluble adhesion molecules in various clinical presentations of coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2004;96(2):235-40.
15. Handin RI, Loscalzo J. Hemostasis, thrombosis, fibrinolysis, and cardiovascular disease. In: Braunwald E, editor. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine.* 4th ed. Philadelphia: Saunders; 1990. p.1767-89.
16. Hara K, Hirowatari Y, Yoshika M, Komiyama Y, Tsuka Y, Takahashi H. The ratio of plasma to whole-blood serotonin may be a novel marker of atherosclerotic cardiovascular disease. *J Lab Clin Med.* 2004;144(1):31-7.
17. Hawiger J. Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug. *Hum Pathol.* 1987;18:111-22.
18. Hirowatari Y, Hara K, Takahashi H. Serotonin: a novel marker for atherosclerotic vascular disease. *Rinsho Byori.* 2004;52(8):693-703.

19. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995;91:2844-50.
20. Mizia-Stec K, Mandecki T, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Okon K, et al. P-selectin and E-selectin in serum of patients with coronary artery disease. *Pol Arch Med Wewn*. 2001;106(6):1137-44.
21. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997;100:2680-90.
22. Pakala R, Willerson JT, Benedict CR. Effect of serotonin, tromboxane A<sub>2</sub>, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 1997;96:2280-86.
23. Puri VK, Verma M, Saxena AK, Shanker K. Platelet serotonergic mechanisms in ischemic heart disease. *Thromb Res*. 1990;57:445-51.
24. Romuk E, Skrzep-Poloczek B, Wojciechowska C, Tomasik A, Birkner E, Wodniecki J, et al. Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(9):657-61.
25. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
26. Ross R. Growth regulatory mechanisms and formation of the lesions of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;748:1-6.
27. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective view for the 1990's. *Nature*. 1993;362:801-9.
28. Serrano Jr CV, Ramires JA, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JC, et al. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression: evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:1276-83.
29. Seuwen K, Pouyssegur J. Serotonin as a growth factor. *Biochem Pharmacol*. 1990;39:985-90.
30. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89:2462-78.
31. Tenaglia AN, Buda AJ, Wilkins RG, Barron MK, Jeffords PR, VO K, et al. Levels of expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 1997;79:742-7.
32. Van den Berg EK, Schmitz JM, Benedict CR, Malloy CR, Willerson JT, Dehmer J. Transcardiac serotonin concentration is increased in selected patients with limiting angina and complex coronary lesion morphology. *Circulation*. 1989;79:116-24.
33. Vikenes K, Farstad M, Nordrehaug JE. Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. *Circulation*. 1999;100(5):483-9.
34. Willerson JT, Yao SK, McNatt J, Bebedict CR, Anderson HV, Golino P, et al. Frequency and severity of cyclic flow alternations and platelet aggregation predict the severity of neointimal proliferation following experimental coronary stenosis and endothelial injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(23):10624-8.