

EFEITO DA DAPIRONA, DO NAPROXENO E DO DICLOFENACO DE POTÁSSIO SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS

*Jovita Ramos Ariede**

*Lilian Perilio**

*Luiz Gustavo Borsetti Ballestero***

*Miriane da Costa Gileno****

RESUMO

Na terapêutica, os anti-inflamatórios não esteróides (Aines) são muito utilizados para tratamento de estados inflamatórios leves e para distúrbios músculo-esqueléticos severos. No entanto, alguns efeitos adversos podem ocorrer devido a sua utilização, como agranulocitose, leucopenia e anemia aplásica. Objetivos: avaliar o efeito de alguns Aines na produção leucocitária; avaliar possível alteração dos grânulos dos neutrófilos; e comparar a contagem global de leucócitos por metodologia manual e automatizada. Foram analisadas 42 amostras de sangue total de ratos fêmeas da raça Wistar. Os animais ingeriram soluções de diclofenaco (DC), dipirona (DP) e naproxeno (NX) em duas concentrações: a plasmática terapêutica e outra dez vezes mais concentrada, durante cinco dias. Foi realizada a contagem diferencial em esfregaço corado e contaram-se leucócitos utilizando metodologia manual com Câmara de Neubauer e por metodologia automatizada (Coulter T-890). Na comparação entre os métodos, não se observaram diferenças significativas em nenhum grupo analisado. Com relação ao número global de leucócitos, também não foram constatadas alterações significativas entre os grupos. Quanto à contagem diferencial, observamos um aumento significativo no número de linfócitos atípicos encontrados no grupo tratado com DP diluída. O presente estudo demonstrou que a dipirona: 1) funcionou como agente tóxico devido à ativação linfocitária e ao grande

*Biomédicos formados pelo Centro Universitário de Araraquara – Uniara.

**Técnico do Laboratório Clínico de Biomedicina do Centro Universitário de Araraquara – Uniara.

***Mestre e doutora em Análises Clínicas (FCF-Unesp), professora de Hematologia Clínica e Bioquímica e Enzimologia Clínica – Uniara e professora de Hematologia Clínica nos Cursos de Especialização em Análises Clínicas e Hematologia e Hemoterapia – Barão de Mauá. E-mail: mcostagileno@yahoo.com.br.

número de neutrófilos com picnose nuclear; 2) o Coulter T-890 pode ser utilizado para a contagem global de leucócitos de animais; 3) os demais anti-inflamatórios estudados não causaram alterações hematológicas.

PALAVRAS-CHAVE: Leucócitos; Agranulocitose; Anti-inflamatórios não esteroidais; Dipirona; Hematologia.

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa realizada refere-se aos efeitos de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (Faines) sobre a produção leucocitária, sendo delimitada nos seguintes fármacos: dipirona, naproxeno e diclofenaco de potássio, os quais podem causar em neutrófilos a agranulocitose (contagem de neutrófilos inferior a 500/mm³) (HAMERSCHLAK; CAVALCANTI, 2005).

Ao ser administrada pela via parenteral, a dipirona apresenta ação analgésica, similar aos anti-inflamatórios não esteroidais. Esse fármaco também é conhecido como metamizol e vem causando muita polêmica, chegando a ser proibido em alguns países, como nos EUA, pelo suposto papel de deprimir a medula óssea, causando anemia aplástica e, principalmente, agranulocitose. Esta se caracteriza pela leve queda do número de granulócitos no sangue, podendo se manifestar por calafrios, febre, ulcerações na garganta e no trato gastrointestinal e dor de cabeça. Já na anemia aplástica os pacientes não apresentam nenhuma célula precursora hematopoética, e os sintomas são hematomas em excesso, fadiga, infecções e hemorragias (DANIELI; LEAL, 2003).

Como possível efeito colateral da dipirona, a agranulocitose foi avaliada em vários países do mundo, de formas diferentes. Publicado em 1986, o Estudo Internacional da Agranulocitose e Anemia Aplástica, também conhecido como Estudo de Boston, tinha como objetivo obter dados a respeito da segurança do uso da dipirona e outros analgésicos, avaliando o risco de agranulocitose e anemia aplástica atribuída ao uso desses fármacos. O resultado desse trabalho mostrou um excessivo risco de agranulocitose devido à dipirona: 1,1 caso por milhão de pessoas afetadas, que administraram o fármaco durante um período de sete dias antes do início da doença. Também foi observado que o índice de incidência de agranulocitose induzida pela dipirona se apresentou com grande diferença nas diferentes regiões analisadas (DANIELI; LEAL, 2003).

Outro estudo teve o objetivo de analisar os analgésicos dipirona, aspirina, diclofenaco e paracetamol com base em quatro aspectos de reações adversas: agranulocitose, anemia aplástica, hemorragia digestiva e anafilaxia. Foi calculada a taxa de mortalidade de cada um dos fármacos, e os resultados demonstraram

que a dipirona foi a substância que apresentou a menor taxa – 25 mortes por 100 milhões de usuários. Esses dados foram confirmados pelo Council for International Organizations of Medical Sciences (Cioms), em 1998, e são as bases que a Anvisa utilizou para manter a dipirona como um medicamento de venda livre no Brasil, no Painel Internacional sobre Segurança da dipirona em julho de 2001 (DANIELI; LEAL, 2003).

Está em fase de desenvolvimento o estudo Latin, para analisar a incidência continental de agranulocitose e anemia aplástica relacionada a medicamentos. O levantamento pretende envolver uma população mais ampla e um número mais expressivo de casos dessas patologias (DANIELI; LEAL, 2003).

O consumo e a prescrição da dipirona são elevados; apesar disso, a experiência indicada pela frequência clínica de agranulocitose é baixa, mas a agranulocitose é ainda um evento adverso pouco freqüente na população pediátrica. É estimado que, quando administrada por períodos inferiores a sete dias, o risco é baixo. Assim mesmo, entre pacientes do sexo feminino e com idade acima de 65 anos, o risco é maior (BANCHERO; GIACHETTO, 2002).

Essa pesquisa é importante em razão do elevado consumo desses anti-inflamatórios – utilizados para tratamento de estados inflamatórios leves (bursites e dismenorréias) e para distúrbios músculo-esqueléticos severos (artrite reumatóide) – pela população sem prescrição médica, pois podem causar várias reações adversas.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito de anti-inflamatórios não esteroidais (Aines) na produção leucocitária. Pesquisar possíveis alterações nos neutrófilos como ausência de seus grânulos, bem como a presença de alterações tóxico-degenerativas.

Pesquisar a ocorrência de alterações envolvendo série eritrocitária e comparar a contagem global de leucócitos por metodologia manual e automatizada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Apresentação e caracterização do universo empírico

A pesquisa foi realizada no biotério do Centro Universitário de Araraquara – Uniara, local onde os ratos são criados e preparados para posterior utilização. Foi utilizada neste estudo uma amostragem de 42 animais do sexo feminino da raça Wistars, procedimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

3.2. Apresentação das técnicas

3.2.1. Medicamentos utilizados

Os anti-inflamatórios (dipirona, naproxeno e diclofenaco de potássio) utilizados neste estudo (Figura 1) foram obtidos em farmácias comuns e a marca comprada foi Medley. As diluições dos medicamentos foram realizadas em solução fisiológica 0,9%.

3.2.2. Administração dos fármacos

Os animais foram tratados durante sete dias consecutivos com os devidos fármacos (o grupo controle, com salina) – administrados por meio de cânula – e sacrificados com éter no oitavo dia. O sangue total para realização dos testes foi colhido com os animais anestesiados por punção cardíaca. As concentrações utilizadas foram a plasmática terapêutica e a concentração dez vezes maior que a plasmática terapêutica. (SHACTER *et al*, 1991; PARFITT, 1986; ZANINI; OGA, 1994).

Os grupos foram divididos da seguinte forma, contendo oito ratos em cada grupo: Grupo controle; Naproxeno Diluído (NX-D); Naproxeno Concentrado (NX-C); Diclofenaco de Potássio Diluído (DC-D); Diclofenaco de Potássio Concentrado (DC-C); Dipirona Diluída (DP-D) e Dipirona Concentrada (DP-C).

3.2.3. Contagem global de leucócitos

Logo após a punção cardíaca, o sangue total foi transferido para tubos contendo o anticoagulante K2-EDTA. A contagem global de leucócitos foi realizada por metodologia automatizada no equipamento T-890, junto ao Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa, e por metodologia manual em Câmara de Neubauer.

Para a metodologia manual o líquido utilizado para se diluir o sangue foi o Líquido de Turk, e a diluição utilizada foi a padrão 1/20. Depois de preparada a diluição – e já homogeneizada –, preencheu-se a câmara no espaço câmara e lamínula com cuidado de não haver falta nem excesso de líquido ou presença de bolhas. A contagem dos leucócitos foi realizada com a objetiva de 10x nos conjuntos laterais de quatro quadrantes da Câmara de Neubauer.

3.2.4. Contagem diferencial de leucócitos

No período máximo de quatro horas após a coleta de sangue, foram realizados esfregaços sanguíneos, corados logo em seguida, utilizando o corante de May-Grunwald-Giemsa. Foi realizada a contagem diferencial em objetiva de imersão, e os valores de referência para ratos se encontram demonstrados no Quadro 1.

Série Branca	Rato
Leucócitos totais/ μ l	9,8
Polinucleares (x1000)	1,9
Linfócitos (x1000)	7,4
Monócitos (x1000)	0,26
Eosinófilos (x1000)	0,16
Basófilos	Raros

Quadro 1. Valores de Referência para Leucócitos de Ratos.
Fonte: CRC Handbook of Laboratory Animal Science, 2002.

3.2.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada comparando os grupos em que foram administradas diferentes concentrações dos anti-inflamatórios e também frente ao grupo controle. Os resultados foram calculados como média +/- desvio padrão (n=8) e as análises estatísticas, realizadas pelo teste – F (duas amostras para variâncias), seguido do teste – t, estabelecendo-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo realizado, comparando-se a contagem manual e eletrônica (Coulter T-890) dos leucócitos totais, não foram observadas diferenças significativas em nenhum grupo analisado. Esse resultado é bastante interessante, demonstrando que o Coulter T-890 se torna uma opção viável para análises hematológicas de sangue de animais, visto que a maioria dos laboratórios de análises clínicas não trabalham com aparelhos específicos (calibrados) para essa finalidade, apenas laboratórios veterinários.

Em relação ao número global de leucócitos, também não foram observadas alterações significativas quando comparados o grupo controle e os grupos em que foram administrados os medicamentos (Figura 1), demonstrando que a gênese leucocitária não foi afetada nesse intervalo de tempo (cinco dias) por nenhum dos medicamentos estudados, mesmo em doses muito altas.

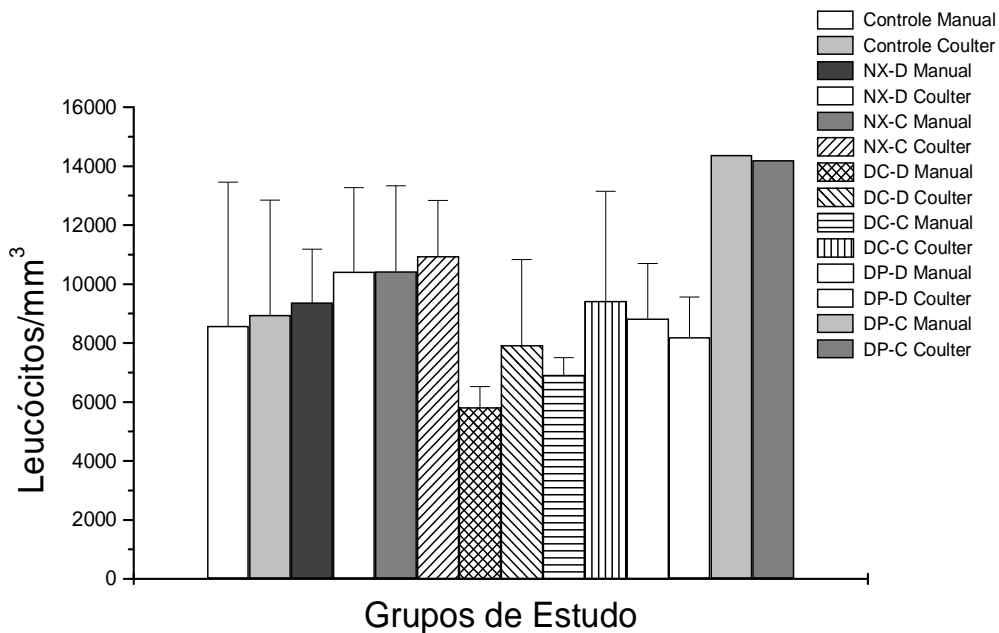


Figura 1. Comparação da contagem manual e automatizada dos grupos de estudo.

Na análise da contagem diferencial dos leucócitos (segmentados, bastonetes, eosinófilos, monócitos e linfócitos), não houve diferenças significativas na comparação com o grupo sem medicamento (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6). Uma observação importante foi a morte da maioria dos ratos tratados com dipirona dez vezes mais concentrada, que está sendo representada nos gráficos por apenas uma amostra – estatisticamente, não foi possível fazer a comparação deste grupo com os demais. Nele também foi observada a ausência de eosinófilos no esfregaço (Figura 4), indicando uma reação de alarme, que demonstra um quadro agudo do organismo. A reação de alarme, hematologicamente caracterizada por eosinopenia, ocorre quando há uma maior liberação de adrenalina, característica de estados inflamatórios e infecciosos agudos e mesmo estresse emocional. A adrenalina induz uma maior liberação de ACTH (hormônio adeno-corticotrófico) pela hipófise, e este, agindo sobre as glândulas suprarrenais, estimula uma maior liberação de corticóides e glicocorticóides, que bloqueiam o eosinófilo na medula óssea.

Com relação à morte da maioria dos ratos tratados com dipirona pura, podemos supor que ocorreu em decorrência da aplasia medular seguida de choque séptico; no entanto, é apenas uma suposição. Para o esclarecimento

completo da causa da morte, seria necessária uma biópsia de medula óssea, o que não foi possível com os recursos financeiros e técnicos disponíveis. Entretanto, poderá ser um tema para trabalhos futuros.

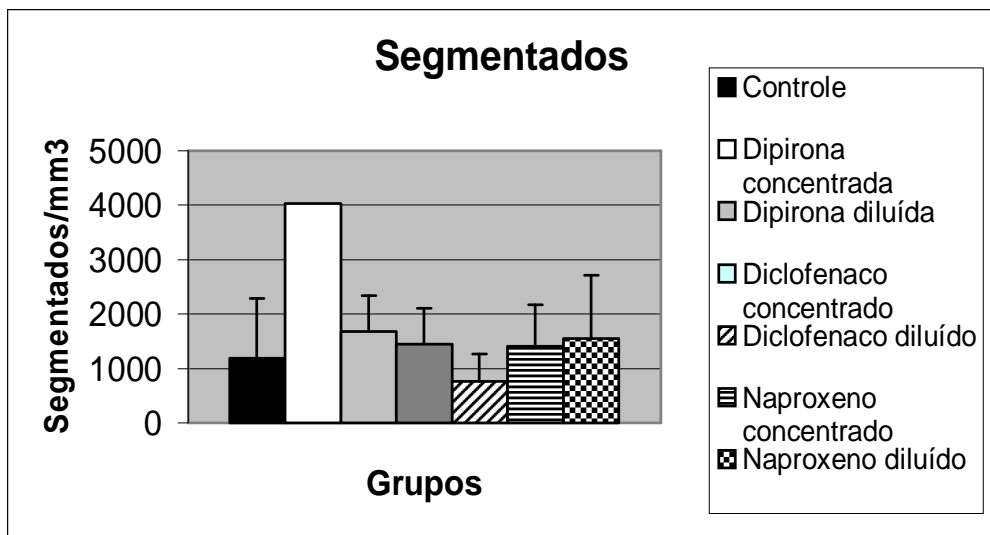


Figura 2. Comparação da contagem diferencial de segmentados nos grupos estudados.

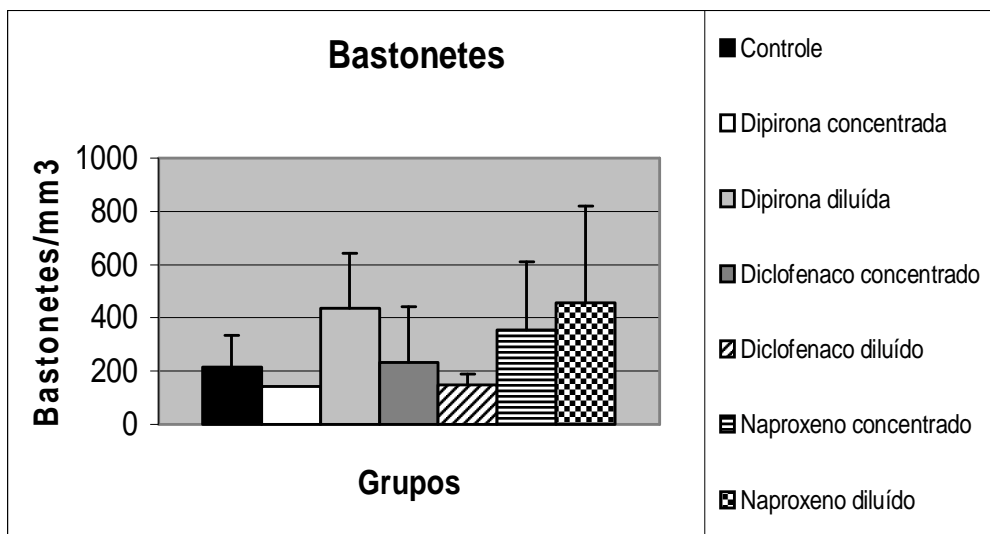


Figura 3. Comparação da contagem diferencial de bastonetes nos grupos estudados.

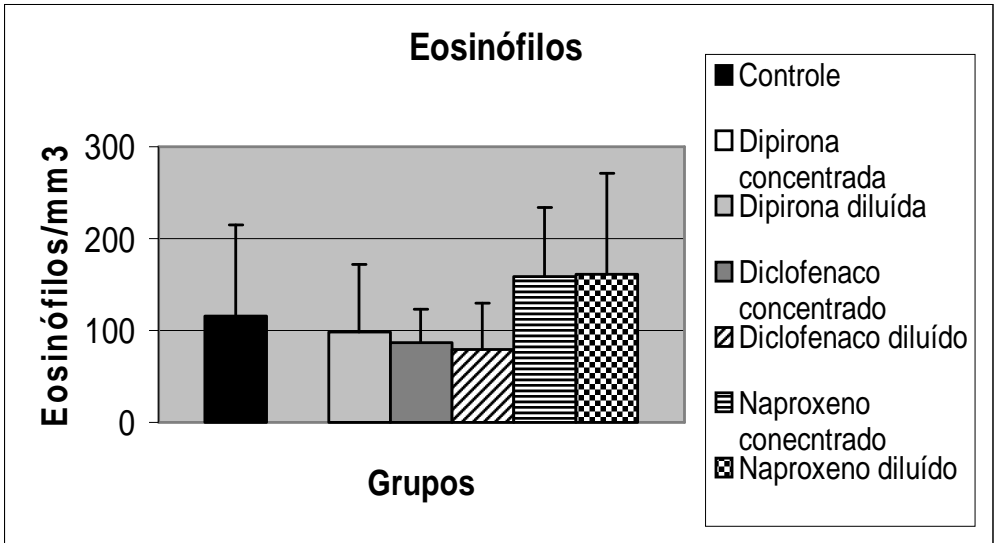


Figura 4. Comparação da contagem diferencial de eosinófilos nos grupos estudados.

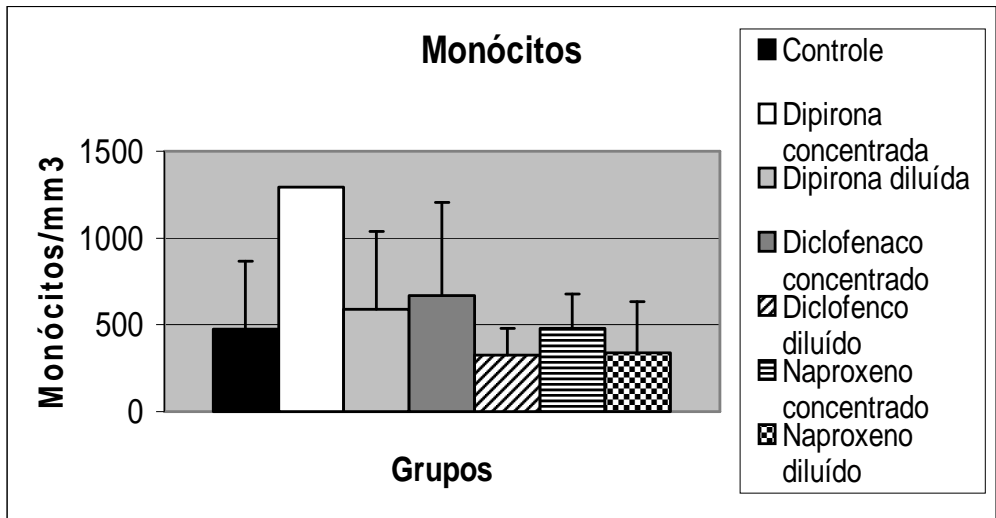


Figura 5. Comparação da contagem diferencial de monócitos nos grupos estudados.

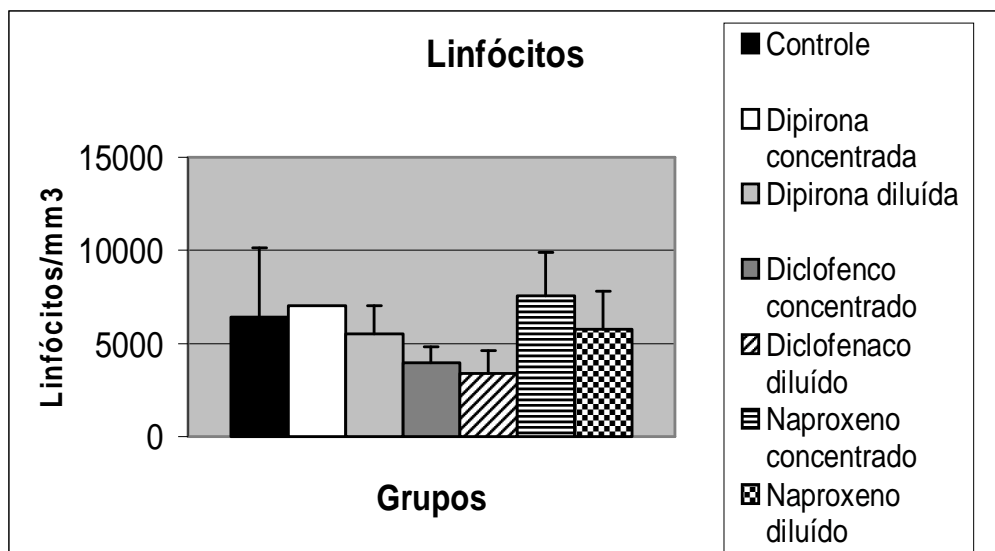


Figura 6. Comparação da contagem diferencial de linfócitos nos grupos estudados.

Nas análises dos esfregaços da dipirona diluída, observamos eosinófilos com o núcleo bastonete em anel, característico também de cachorros (REBAR *et al*, 2003).

Um outro importante resultado encontrado neste estudo ocorreu durante a contagem diferencial de linfócitos atípicos no grupo tratado com dipirona diluída. Foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na sua contagem (Figura 7), também constatado entre os ratos tratados com dipirona pura. No grupo com dipirona diluída também se detectou a presença de raro a moderado número de neutrófilos, o que caracteriza picnose nuclear e de eritrócitos com moderada a acentuada policromasia. A picnose nuclear é uma alteração tóxico-degenerativa dos neutrófilos e acontece em processos infecciosos e intoxicações bastante graves, resultando em cariorrex. Este resultado, juntamente com o de linfócito atípico, demonstra que a dipirona funcionou como agente tóxico para o organismo.

A policromasia ocorre quando reticulócitos são liberados em maior quantidade para o sangue periférico, em razão de hemorragia, hemólise ou tratamento com vitaminas que estavam deficientes no organismo, indicando eritroformação e uma medula óssea funcional.

Como visualmente (fezes, urina e orifícios) os ratos em estudo não estavam apresentando perda sanguínea, podemos supor que a dipirona pode ter causado destruição eritrocitária (hemólise). Este resultado se torna conflitante com a suposição de aplasia medular, pois a reticulocitose é um importante indício de

atividade medular. Esta contradição torna ainda mais interessante a continuação deste trabalho.

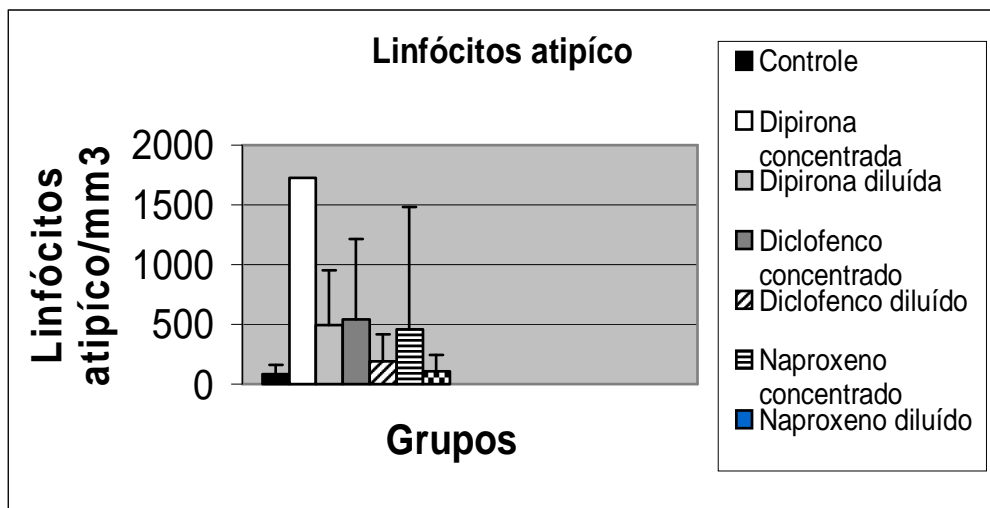


Figura 7. Comparação da contagem de linfócitos atípicos nos grupos estudados.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a dipirona funcionou como agente tóxico, devido à ativação linfocitária e ao grande número de neutrófilos com picnose nuclear, e que pode estar causando uma leve hemólise, resultando no aumento do número de reticulócitos no sangue periférico (policromasia). Mostrou também que a dipirona concentrada induz a uma resposta aguda do organismo, visualizada pela reação de alarme, e que a morte dos ratos tratados com o fármaco concentrado ocorreu, provavelmente, em razão de aplasia medular e consequente infecção generalizada.

O trabalho também constatou que o equipamento hematológico Coulter T-890 pode ser utilizado para a contagem global de leucócitos de animais. Os demais anti-inflamatórios estudados (diclofenaco de potássio e naproxeno) não causaram alterações hematológicas nas doses e tempo de administração estudados.

No entanto, os mecanismos propostos neste trabalho precisam ainda ser esclarecidos, o que se torna uma inspiração e um impulso para a realização de pesquisas científicas nesta área.

Com relação à agranulocitose, não foram observadas alterações em grânulos de neutrófilos.

REFERÊNCIAS

BANCHERO, PATRICIA and GIACHETTO, GUSTAVO. Agranulocitosis inducida por medicamentos. **Arch. Pediatr. Urug.**; v. 73 (2): p.74-77, June 2002.

DANIELI, P.; LEAL, M. D. Avaliação da segurança da dipirona: uma revisão. **Revista Brasileira Farmacêutica**. n. 84 (1): p.17 - p.20, 2003.

HAMERSCHLAK, N.; CAVALCANTI, A. B. Neutropenia, agranulocitose e dipirona. **São Paulo Med. J.**; v.123 (5), p.247-249, set./nov. 2005.

HAU, J.; VAN HOOSIER, G. L. Handbook of Laboratory Animal Science. Volume I: Essential Principles and Practices. **Second Edition, CRC PRESS**, oct 28 2002.

REBAR, A. H. et al. **Guia de Hematologia para cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003.

ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1994.

TITLE: EFFECT OF DIPYRONE, NAPROXEN AND DICLOFENAC POTASSIUM ON BLOOD CELLS

ABSTRACT

In therapy, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used to treat mild conditions and severe musculoskeletal disorders. However, some effects may occur due to their use, such as agranulocytosis, leukopenia and aplastic anemia. Objectives: to evaluate the effect of some NSAIDs on leukocyte production; to evaluate possible modification of the granules of neutrophils and to compare the total leukocyte count, by using manual and automated methods. 42 samples of whole blood of female rats, Wistar race, were analyzed in this experiment. The animals ingested solutions of diclofenac (DC), dipyrone (DP) and naproxen (NX), in two concentrations: the therapeutic plasma and another ten times more concentrated, for 5 days. We performed differential counts on stained smear and leukocytes were counted

using manual methods with the Neubauer counting chamber and automated method (Coulter T-890). The comparison between the methods presented no significant differences in any analyzed group. Regarding to the overall number of leukocytes, no significant changes between the groups were observed. Regarding to the differential count we observed a significant increase in the number of atypical lymphocytes found in the group treated with diluted DP. This study demonstrated that dipyron: 1) served as a toxic agent due to lymphocyte activation and the large number of neutrophils with nuclear pyknosis; 2) the Coulter T-890 can be used for total leukocyte count of animals; 3) other anti-inflammatory drugs studied did not cause abnormalities.

KEYWORDS: *Leukocytes; Agranulocytosis; NSAIDs; Dipyron; Hematology.*