

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO DICLOFENACO SÓDICO A RATOS SUBMETIDOS A SUTURAS CÓLICAS

JOÃO ELIAS CALACHE NETO
FREDERICO AUN
RIAD N. YOUNES

CALACHE NETO JE, AUN F, YOUNES RN - Efeitos da administração do diclofenaco sódico a ratos submetidos a suturas cólicas. *Rev bras Colo-Proct*, 1992; 12(2): 37-46.

RESUMO: A ação do diclofenaco sódico sobre o processo de cicatrização de suturas cólicas em ratos foi observada em modelo experimental que consistiu na secção e sutura do cólon ascendente desses animais. Foram estudados 90 ratos, sendo que 60 ratos (grupo I) foram submetidos a procedimento operatório e à administração diária de diclofenaco sódico (10 mg/kg) ou soro fisiológico e sacrificados em diferentes intervalos de tempo (três, cinco, e sete dias). Foram observados outros 30 ratos (grupo II) não submetidos ao ato operatório, e que receberam a droga (10 mg/kg), soro fisiológico ou não tratados (subgrupo padrão). Por fim, foram comparados os resultados obtidos com a administração da droga entre animais operados e não operados e sacrificados no sétimo dia de pós-operatório (grupo III). Nos ratos operados foram observados os aspectos cirúrgicos. Todos os animais (operados e não operados) foram submetidos à observação dos aspectos ponderais, das médias dos níveis plasmáticos de proteínas totais e frações e das médias dos níveis de hidroxiprolina na linha de sutura ou na área equivalente. Concluiu-se que o diclofenaco sódico pode interferir no processo de cicatrização, uma vez que: a) houve maior ocorrência de deiscências da incisão abdominal (53,3%) e de alterações da sutura cólica (43,3%) entre os animais tratados com diclofenaco sódico; b) entre os animais tratados com diclofenaco sódico (operados e não operados) houve 12,5% de óbitos, enquanto nenhum animal tratado com o soro fisiológico evoluiu para óbito; c) não houve ganho ponderal entre os animais tratados com diclofenaco sódico (operados e não operados); d) entre os animais que receberam a droga, houve diminuição dos níveis plasmáticos de proteínas totais

e frações e nos níveis de hidroxiprolina na linha de sutura dos ratos operados.

UNITERMOS: cicatrização de feridas cólicas; cólon, cirurgia; suturas, efeitos adversos; diclofenaco sódico

As suturas cólicas sempre foram motivo de preocupação para os cirurgiões, uma vez que a maioria das complicações e um percentual significativo de mortes de pacientes submetidos a cirurgia dos cólons decorrem de deiscências das anastomoses (1,2).

Embora seja difícil determinar o momento exato em que pode ocorrer a deiscência de uma anastomose, Everett (1974) (3) sugeriu que ela deva ocorrer nos primeiros dias do processo de cicatrização, mais especificamente durante a fase da resposta inflamatória.

Dentre os fatores que são fundamentais para assegurar uma anastomose bem-sucedida, interessa-nos salientar aqueles que interferem na resposta inflamatória na linha de cicatrização, alterando a proliferação fibroblástica e, conseqüentemente, a síntese de colágeno. Devemos ressaltar aqui a importância desse elemento no processo de cicatrização, por ser o componente responsável pela força tênsil da sutura (4, 5).

Vários estudos mostram que a inibição da síntese de prostaglandinas pode ser responsável por alterações prejudiciais na relação síntese/degradação de colágeno (6, 7, 8).

Os antiinflamatórios não hormonais (AINH) podem interferir sobre o mecanismo cicatricial, ao inibir a síntese de prostaglandinas, geralmente ao nível da enzima cicloxigenase (8, 9), e assim diminuir a quantidade de colágeno em feridas e, conseqüentemente, reduzir sua resistência à tração (7, 10, 11).

Entre os AINH, o diclofenaco sódico (DS) tem sido freqüentemente empregado em rotina clínica, tanto por via

oral como por via intramuscular, seja no período pós-operatório imediato ou após diversos tipos de traumatismo (12).

Alguns estudos já mostraram grande preocupação com os efeitos do diclofenaco sódico sobre o processo de cicatrização de feridas cirúrgicas (10, 11).

Uma vez que essa droga tem um potencial de efeitos indesejáveis de vital importância para o sucesso da cirurgia, e não tendo encontrado quaisquer estudos sobre a ação do DS sobre suturas cólicas, por este estudo propomo-nos uma investigação de seu efeito sobre a cicatrização dessas suturas.

Para tanto, desenvolvemos um modelo experimental, que consistiu na secção e sutura do cólon em ratos, seguidas, no pós-operatório, da administração de DS. Observamos, então, a influência da droga sobre o metabolismo de colágeno na linha de sutura, através da verificação do conteúdo local de hidroxiprolina. Nesses animais, foram estudados ainda outros aspectos diretamente relacionados com a cicatrização das feridas, assim como dados laboratoriais referentes às proteínas totais e frações.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 90 ratos Wistar machos, pesando entre 180 e 270 gramas, os quais foram divididos em dois grupos. Todos os animais do grupo I (60 ratos) foram submetidos a procedimento cirúrgico padrão, descrito a seguir, sendo divididos em três subgrupos de 20 ratos cada, para sacrifício nos terceiro (subgrupo I-3), quinto (subgrupo I-5) e sétimo (subgrupo I-7) dias do pós-operatório. Após a cirurgia, os ratos foram sorteados de modo que a metade deles recebesse soro fisiológico (SF) (0,3 ml/dia, por via intramuscular), e a outra metade recebesse DS (10 mg/kg/dia por via intramuscular) em igual volume até a véspera do sacrifício.

Nenhum animal do grupo II (30 ratos) foi submetido à cirurgia. Esse grupo foi subdividido em três subgrupos de 10 ratos cada: subgrupo "padrão" (P), subgrupo "soro fisiológico" (SF) e subgrupo "diclofenaco sódico" (DS). Os animais do subgrupo P foram submetidos apenas aos procedimentos da coleta de amostras e a seguir sacrificados; os do subgrupo SF receberam SF (0,3 ml/dia, por via intramuscular), e os do subgrupo DS receberam DS (10 mg/kg/dia, por via intramuscular) durante sete dias anteriores ao sacrifício.

Também foram estudados comparativamente 40 animais, que foram sacrificados após sete dias da administração da droga (grupo III). Esse grupo foi composto de 20 animais pertencentes ao grupo I, ou seja, submetidos ao procedimento cirúrgico (OP), e de 20 animais não operados (NOP) pertencentes ao grupo II.

Procedimento cirúrgico - Os animais do grupo I foram submetidos à seguinte seqüência de procedimentos: a) anestesia geral inalatória com éter etílico; b) assepsia da pele com solução de povidine; c) laparotomia mediana; d) hemissecção transversal da parede contra-mesenterial do

cólon ascendente a 1,5 cm do ceco; e) sutura da secção do cólon ascendente com pontos separados de fio de nylon monofilamentar 6-0, em plano total evertido (6 a 7 pontos) em sentido transversal; f) fechamento da parede abdominal em dois planos: peritônio, aponeurose e músculos, num plano único de sutura contínua, e pele, com pontos separados (4 a 5 pontos), ambos com fio de nylon monofilamentar 4-0.

Imediatamente após o término do ato cirúrgico foi feito sorteio para determinar a qual subgrupo pertenceria o animal. Deste modo, os animais dos subgrupos I-3, I-5, I-7, receberam soro fisiológico ou diclofenaco sódico, que foram ministrados na musculatura da face posterior interna da coxa direita (nos dias ímpares) ou esquerda (nos dias pares), diariamente, até a véspera do sacrifício.

Durante o período de administração das drogas, os animais foram mantidos em gaiolas com o máximo de cinco ratos em cada uma, e alojados em biotério padrão com temperatura de 24°C, ração própria para a espécie e água à vontade. Diariamente eles eram pesados, recebendo, em seguida, o medicamento sorteado no dia da cirurgia, em dose proporcional ao peso medido.

Procedimento do sacrifício - Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento de sacrifício: a) ressecção da parede abdominal anterior, de forma a se manter margens laterais de 2 cm ao longo de toda a extensão da incisão abdominal, prolongando-se a ressecção até a parede anterior do tórax, com abertura do diafragma, pleura e pericárdio; b) punção cardíaca com seringa heparinizada para coleta de sangue, que era aspirado até o óbito do animal; c) ressecção numa extensão de 4 cm do cólon ascendente, sendo 1 cm proximal e 3 cm distais à sutura.

No ato do sacrifício, foram observados e registrados os aspectos da incisão da parede abdominal (normal ou deiscência), a intensidade de aderências na cavidade peritoneal (leve ou intensa), a presença de fibrina e secreções intra-abdominais, além do aspecto da sutura cólica (abscesso pericólico e/ou deiscência) dos animais do grupo I. Os que morreram durante o período de estudo foram autopsiados e repostos.

O sacrifício dos animais do grupo II seguiu o mesmo padrão, à exceção dos aspectos relacionados à sutura cólica, que inexistia neste grupo.

Processamento das amostras do tecido cólico - Após limpeza do conteúdo fecal de sua luz, o cólon ascendente foi liberado de suas aderências, aberto longitudinalmente pela face mesenterial, e, a seguir, fixado aberto em um anteparo de cortiça.

Depois de retirados os fios com mínima manipulação, a sutura foi separada num fragmento de aproximadamente 4 mm de largura. Nos animais não operados foi separado um fragmento de tecido cólico sem sutura de igual proporção e também a 1,5 cm do ceco.

A seguir, o fragmento foi recolhido e acondicionado em papel laminado, identificado com o código correspondente ao do rato sacrificado e mantido a -25°C. Em seguida, foi encaminhado para estudo do colágeno através da

dosagem da 4-hidroxiprolina, seguindo-se a técnica de Bergman & Loxley (1963). Os resultados foram expressos em microgramas de 4-hidroxiprolina por um miligrama de tecido liofilizado.

Processamento das amostras de sangue - O sangue colhido pela punção cardíaca foi dividido em duas alíquotas. Aquela destinada às determinações bioquímicas foi centrifugada à temperatura ambiente em 2.500 rotações por minuto, durante 15 minutos, procedendo-se, a seguir, à separação do soro, que foi encaminhado para quantificação das proteínas totais (método BIURETO) e frações (método VBC).

Análise estatística - Para a avaliação dos dados quantitativos, às tabelas individuais 2 x 2 foi aplicado o teste exato de Fisher. Cada conjunto de tabelas 2 x 2 foi analisado, usando-se o teste de Mantel-Haenszel, com a aplicação de $X^2 = 3,84$ como valor crítico para a decisão de significância.

Para a comparação de médias das combinações tempo/droga usou-se a técnica de análise de variância para um e dois critérios de classificação e testes de pares de médias segundo o método de Tukey HSD (*honest significant difference*). Para a tomada de decisão de significância, utilizou-se o nível de 3,81 como valor crítico para a análise de um critério (para o grupo II), assim como o nível 4,16 para a análise de dois critérios (para o grupo I).

Para a comparação de médias das combinações cirurgia/droga usou-se a técnica de análise de variância para dois critérios de classificação e testes de pares de médias segundo o método de Tukey HSD, aplicando-se o nível de 3,84 como valor crítico para a decisão de significância (para o grupo III).

Para a determinação da significância estatística, optou-se por um nível de 5% de probabilidade.

Os dados foram armazenados em programa Lotus 1-2-3, e em seguida empregou-se o programa estatístico SPSS.

RESULTADOS

Resultados do conjunto de 60 ratos submetidos ao procedimento cirúrgico (grupo I)

Hidroxiprolina

Pela análise de variância para as médias dos níveis de hidroxiprolina na linha de sutura observou-se diferença significativa, quando analisados os animais que receberam SF comparados com os que receberam diclofenaco sódico. Não houve, contudo, diferença significativa na análise dos animais, quando comparados nos diferentes dias de sacrifício. Houve interação significativa entre os efeitos principais, quais sejam: tratamento (SF ou DS) e dia de sacrifício (3, 5 e 7). Empregando-se o teste de Tukey, observou-se que, com exceção do grupo de animais sacrificados no terceiro dia de pós-operatório, a média dos níveis de hidroxiprolina foi menor na linha de sutura nos animais

que receberam DS com relação aos que receberam SF. Essa diferença, porém, não foi significativa (Tabela 1).

Tabela 1 - Níveis de hidroxiprolina na linha de sutura, segundo subgrupo e droga (média e erro padrão da média) (grupo I).

Subgrupo	Droga	Hidroxiprolina (mg/mg)
I-3	Soro fisiológico	7,55 ± 0,92
	Diclofenaco sódico	8,61 ± 0,83
I-5	Soro fisiológico	8,76 ± 0,38
	Diclofenaco sódico	6,55 ± 0,77
I-7	Soro fisiológico	10,22 ± 0,76
	Diclofenaco sódico	7,21 ± 0,95

Teste de Tukey (análise de dois critérios)

Valor crítico = 4,16

Valores calculados: I-3 (SF x DS) = 1,33 (ns); I-5 (SF x DS) = 2,79 (ns); I-7 (SF x DS) = 3,81 (ns)

Aspectos cirúrgicos

Aspecto da incisão abdominal: no grupo que recebeu DS, a incidência de deiscências das incisões abdominais foi significativamente maior. Essa influência foi mais acentuada com períodos de exposição mais prolongados (cinco e sete dias) (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de ratos segundo aspecto da incisão abdominal, subgrupo e droga (grupo I).

Aspecto da incisão	Subgrupos					
	I-3		I-5		I-7	
	Droga		Droga		Droga	
	SF	DS	SF	DS	SF	DS
Normal	10	8	9	2	9	4
Deiscente	0	2	1	8	1	6

Teste de Mantel-Haenszel

Valor crítico: $X^2 MH = 3,84$

Valor calculado: $X^2 MH = 16,47 (s)$

Alterações na cavidade abdominal: essas alterações foram significativamente mais frequentes nos animais que receberam DS, tendo sido observadas desde o terceiro dia após a operação (Tabela 3).

Aderências na cavidade abdominal: o DS elevou significativamente o número de ratos com aderências intensas, evidenciadas também a partir do terceiro dia de pós-operatório (Tabela 4).

Alterações na sutura cólica: não houve diferença significativa na incidência de deiscências ou abscessos das suturas cólicas nos animais que receberam DS (Tabela 5).

Óbitos

Só houve óbitos de animais que receberam DS, embora essa diferença não tenha se mostrado estatisticamente significativa (Tabela 6).

Tabela 3 - Número de ratos segundo alterações na cavidade abdominal, subgrupo e droga (grupo I).

Alterações na cavidade abdominal*	Subgrupos					
	I-3		I-5		I-7	
	Droga		Droga		Droga	
	SF	DS	SF	DS	SF	DS
Ausentes	10	4	7	6	9	7
Presentes	0	6	3	4	1	3

*Alterações encontradas: presença de fibrina/presença de secreção de aspecto purulento.

Teste de Mantel-Haenszel

Valor crítico: $X^2 MH = 3,84$

Valor calculado: $X^2 MH = 6,43 (s)$

Tabela 4 - Número de ratos segundo presença de aderências na cavidade abdominal, subgrupo e droga (grupo I).

Aderência*	Subgrupos					
	I-3		I-5		I-7	
	Droga		Droga		Droga	
	SF	DS	SF	DS	SF	DS
Leve	9	3	8	5	9	4
Intensa	1	7	2	5	1	6

*Aderência leve: um ou dois órgãos aderidos à sutura.

Aderência intensa: três ou mais órgãos aderidos à sutura

Teste de Mantel-Haenszel

Valor crítico: $X^2 MH = 3,84$

Valor calculado: $X^2 MH = 13,39 (s)$

Tabela 5 - Número de ratos segundo alterações na sutura cólica, subgrupo e droga (grupo I).

Alterações na sutura cólica*	Subgrupos					
	I-3		I-5		I-7	
	Droga		Droga		Droga	
	SF	DS	SF	DS	SF	DS
Ausentes	8	4	7	5	10	8
Presentes	2	6	3	5	0	2

*Alterações encontradas na sutura: deiscência bloqueada e/ou abscesso pericólico.

Teste de Mantel-Haenszel

Valor crítico: $X^2 MH = 3,84$

Valor calculado: $X^2 MH = 1,33 (ns)$

Aspectos ponderais

A Figura 1 mostra as curvas progressivas da média de peso dos animais de cada subgrupo. Pode-se observar que os animais tratados com DS apresentaram tendência à perda de peso.

Tabela 6 - Número de ratos segundo óbito, subgrupo e droga (grupo I).

Óbito	Subgrupos					
	I-3		I-5		I-7	
	Droga		Droga		Droga	
	SF	DS	SF	DS	SF	DS
Sim	0	0	0	1	0	2
Não	10	10	10	9	10	8

Teste de Mantel-Haenszel

Valor crítico: $X^2 MH = 3,84$

Valor calculado: $X^2 MH = 3,10 (ns)$

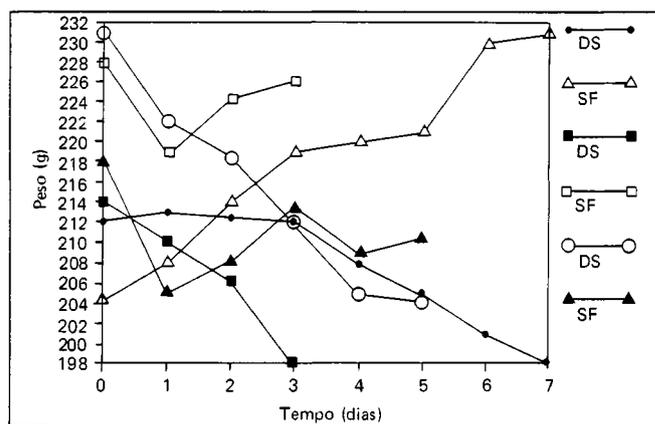


Fig. 1 - Peso dos animais do grupo I, segundo droga e tempo

Pela análise de variância para as médias das diferenças de peso, observou-se que houve diferença significativa, ora quando analisados os animais que receberam SF comparados com os que receberam DS, ora quando comparados os animais nos diferentes dias de sacrifício (três, cinco e sete), ocorrendo o mesmo com relação à interação entre os efeitos principais, quais sejam: tratamento (SF ou DS) e dia do sacrifício (três, cinco e sete). Ao emprego do teste de Tukey, observou-se que: (a) os animais que receberam DS durante sete dias apresentaram perda de peso significativa, quando comparados com os animais que receberam SF; (b) os ratos que receberam SF apresentaram ganho de peso significativo no sétimo dia após a cirurgia; (c) entre os ratos tratados com DS houve diminuição de peso em todos os subgrupos de sacrifício, mais intensa no quinto dia de pós-operatório. As diferenças, porém, não foram estatisticamente significativas (Tabela 7).

Proteínas totais e frações

Pela análise de variância para as médias de proteínas totais, albumina e globulinas, observou-se que: a) houve diferença significativa quando analisados os animais que receberam SF em comparação com os que receberam DS; b) houve diferença significativa quando comparados os animais nos diferentes dias de sacrifício (três, cinco e sete); c) não houve interação significativa entre os efeitos

Tabela 7 - Diferença de peso (em gramas) dos animais do grupo I segundo subgrupo e droga (média e erro-padrão da média).

Droga	Subgrupos		
	I-3	I-5	I-7
Soro fisiológico	-0,90 ± 2,25	-9,30 ± 3,76	26,80 ± 2,99
Diclofenaco sódico	-15,50 ± 3,15	-23,40 ± 4,05	-12,90 ± 4,85

Teste de Tukey HSD (análise de dois critérios)
Valor crítico = 4,16
Valores calculados:

I-3 (SF x DS) = 4,04 (ns)	SF (I-3 x I-5) = 2,32 (ns)	DS (I-3 x I-5) = 2,18 (ns)
I-5 (SF x DS) = 3,90 (ns)	SF (I-3 x I-7) = 7,66 (s)	DS (I-3 x I-7) = 0,71 (ns)
I-7 (SF x DS) = 10,98 (s)	SF (I-5 x I-7) = 9,99 (s)	DS (I-5 x I-7) = 2,90 (ns)

principais, quais sejam: tratamento (SF ou DS) e dia do sacrifício (três, cinco e sete). Empregando-se o teste de Tukey (Tabela 8), observou-se que:

1) Com relação às proteínas totais: a) a administração de DS diminuiu significativamente os níveis de proteínas totais dos animais tratados comparados com os que receberam SF; b) quando analisados os animais que receberam SF, os níveis de proteínas totais foram significativamente maiores nos animais sacrificados no quinto dia, com relação aos do terceiro dia; c) de maneira análoga, quando comparados os animais que receberam DS, os níveis médios de proteínas totais foram significativamente maiores nos animais sacrificados no quinto dia, com relação aos sacrificados no terceiro dia.

2) Com relação à albumina: a) os níveis médios de albumina foram menores nos animais que receberam DS em todos os subgrupos de sacrifício (três, cinco e sete),

quando comparados com os que receberam SF. Essa variação foi significativa apenas nos animais sacrificados com três dias de pós-operatório; b) houve queda significativa dos níveis médios de albumina nos animais que receberam SF e foram sacrificados no sétimo dia, quando comparados com os sacrificados no terceiro e quinto dias de pós-operatório; c) quando analisado o grupo de animais que recebeu DS, a duração do tratamento não influenciou significativamente os níveis de albumina.

3) Com relação às globulinas: a) a diferença não foi significativa nos níveis médios de globulinas, quando comparados os animais que receberam SF com os que receberam DS em todos os subgrupos de sacrifício nos dias três, cinco e sete; b) houve aumento progressivo e significativo nos níveis de globulina dos animais que receberam SF até o quinto e sétimo dias após a cirurgia; c) relação semelhante foi observada nos animais tratados com DS, tornando-se significativa no sétimo dia de pós-operatório, quando comparada com o terceiro dia.

Resultados do conjunto de 30 ratos não submetidos ao procedimento cirúrgico (grupo II)

Hidroxirolina

A análise de variância para as médias dos níveis de hidroxirolina na região do cólon ascendente equivalente à linha de sutura do grupo operado não mostrou diferença significativa entre os três subgrupos. Empregando-se o teste de Tukey, não houve diferença significativa entre as médias dos níveis de hidroxirolina na área equivalente à linha de sutura nos animais dos três subgrupos (Tabela 9).

Tabela 8 - Níveis de proteínas totais, albumina e globulinas segundo subgrupo e droga (média e erro-padrão da média) (grupo I).

Subgrupo	Proteínas Droga	Albumina Totais (g/dl)	Globulinas (g/dl)	(g/dl)
I-3	Soro fisiológico	6,19 ± 0,12	3,91 ± 0,16	2,29 ± 0,22
	Diclofenaco sódico	5,18 ± 0,16	3,22 ± 0,17	1,96 ± 0,16
I-5	Soro fisiológico	6,98 ± 0,31	3,98 ± 0,12	3,00 ± 0,12
	Diclofenaco sódico	6,11 ± 0,11	3,60 ± 0,11	2,51 ± 0,13
I-7	Soro fisiológico	6,43 ± 0,09	3,24 ± 0,05	3,19 ± 0,07
	Diclofenaco sódico	5,62 ± 0,15	3,03 ± 0,18	2,59 ± 0,09

Teste de Tukey HSD (Análise de dois critérios)

Valor crítico = 4,16

Valores calculados:

Proteínas totais	Albumina	Globulinas
I-3 (SF x DS) = 6,65 (s)	I-3 (SF x DS) = 4,75 (s)	I-3 (SF x DS) = 2,24 (ns)
I-5 (SF x DS) = 5,73 (s)	I-5 (SF x DS) = 2,61 (ns)	I-5 (SF x DS) = 3,32 (ns)
I-7 (SF x DS) = 5,34 (s)	I-7 (SF x DS) = 1,44 (ns)	I-7 (SF x DS) = 4,07 (ns)
SF (I-3 x I-5) = 5,20 (s)	SF (I-3 x I-5) = 0,48 (ns)	SF (I-3 x I-5) = 4,81 (s)
SF (I-3 x I-7) = 1,50 (ns)	SF (I-3 x I-7) = 4,61 (s)	SF (I-3 x I-7) = 6,10 (s)
SF (I-5 x I-7) = 3,62 (ns)	SF (I-5 x I-7) = 5,09 (s)	SF (I-5 x I-7) = 1,28 (ns)
DS (I-3 x I-5) = 6,13 (s)	DS (I-3 x I-5) = 2,61 (ns)	DS (I-3 x I-5) = 3,73 (ns)
DS (I-3 x I-7) = 2,90 (ns)	DS (I-3 x I-7) = 1,30 (ns)	DS (I-3 x I-7) = 4,27 (s)
DS (I-5 x I-7) = 3,23 (ns)	DS (I-5 x I-7) = 3,92 (ns)	DS (I-5 x I-7) = 0,54 (ns)

Tabela 9 - Níveis de hidroxiprolina na área equivalente à linha de sutura, segundo subgrupo (média e erro padrão da média) (grupo II)

Subgrupo	Hidroxiprolina (mg/mg)
Padrão	11,15 ± 1,28
Soro fisiológico	9,09 ± 1,02
Diclofenaco sódico	9,31 ± 0,80

Teste de Tukey HSD (Análise de um critério)

Valor crítico = 3,81

Valores calculados = $P \times SF = (ns)$; $P \times DS = (ns)$; $SF \times DS = (ns)$

Óbitos

Não houve diferença significativa entre os subgrupos, relativamente à ocorrência de óbitos neste grupo (Tabela 10).

Tabela 10 - Número de ratos segundo óbito e subgrupo (grupo II)

Óbito	Subgrupo e droga	
	Soro fisiológico	Diclofenaco sódico
Sim	0	2
Não	10	8

Teste exato de Fisher

Valor crítico: 2,22

Valor calculado: 0,55 (ns)

Proteínas totais e frações

Comparando-se os animais dos subgrupos padrão (P), SF (SF) e DS (DS), a análise de variância para as médias de proteínas totais e frações mostrou diferenças significativas: a) entre as médias dos níveis de proteínas totais; b) entre as médias dos níveis de albumina; c) entre as médias dos níveis de globulinas. Empregando-se o teste de Tukey, observou-se que: a) nos animais que receberam DS, os níveis médios de proteínas totais foram significativamente menores, quando comparados com os animais que receberam SF e com os do subgrupo padrão; b) o nível médio de albumina foi significativamente menor nos animais que receberam DS, quando comparados com os do subgrupo padrão; c) a administração de DS reduziu significativamente os níveis médios de globulinas, quando comparados com os animais tratados com SF e com os do subgrupo padrão (Tabela 11).

Resultados do conjunto de 40 ratos sacrificados após sete dias de administração das drogas (grupo III)

Hidroxiprolina

Pela análise de variância para as médias dos níveis de hidroxiprolina, observou-se que não houve diferença significativa entre esses valores na linha de sutura ou na área equivalente à linha de sutura entre os animais que recebe-

Tabela 11 - Níveis de proteínas totais, albumina e globulinas, segundo subgrupo (média e erro-padrão da média) (grupo II).

Subgrupo	Proteínas totais (g/dl)	Albumina (g/dl)	Globulinas (g/dl)
Padrão	7,36 ± 0,17	4,13 ± 0,08	3,23 ± 0,15
Soro fisiológico	6,92 ± 0,16	3,77 ± 0,10	3,15 ± 0,14
Diclofenaco sódico	6,03 ± 0,16	3,40 ± 0,15	2,63 ± 0,11

Teste de Tukey HSD (análise de um critério)

Valor crítico: 3,81

Valores calculados:

Proteínas totais	Albumina	Globulinas
$P \times SF = (ns)$	$P \times SF = (ns)$	$P \times SF = (ns)$
$P \times DS = (s)$	$P \times DS = (s)$	$P \times DS = (s)$
$SF \times DS = (S)$	$SF \times DS = (ns)$	$SF \times DS = (s)$

ram SF e DS, nem entre os operados e os não-operados. Não houve interação significativa, quando comparados os efeitos principais entre si. Empregando-se o teste de Tukey, confirmou-se a ausência de diferença significativa entre os níveis de hidroxiprolina, quando comparados os subgrupos de animais operados com os dos não-operados, assim como entre os tratados com DS e SF (Tabela 12).

Tabela 12 - Níveis de hidroxiprolina na linha de sutura (animais operados - OP) e na área equivalente à linha de sutura (animais não operados - NOP), de acordo com subgrupo e droga (média e erro-padrão da média) (grupo III).

Subgrupo	Droga	Hidroxiprolina (mg/mg)
Operados	Soro fisiológico	10,22 ± 0,76
	Diclofenaco sódico	7,21 ± 0,95
Não operados	Soro fisiológico	9,09 ± 1,02
	Diclofenaco sódico	9,31 ± 0,80

Teste de Tukey HSD

Valor crítico = 3,84

Valores calculados:

$SF (OP \times NOP) = (ns)$

$DS (OP \times NOP) = (ns)$

$OP (SF \times DS) = (ns)$

$NOP (SF \times DS) = (ns)$

Evolução ponderal

As Figuras 2 e 3 mostram as curvas das médias de peso dos animais operados e não-operados, em função do tempo. Nota-se, em ambos os subgrupos, que a administração de DS impediu o ganho ponderal esperado, quando comparado com os animais que receberam SF.

Pela análise de variância para as médias das diferenças de peso do conjunto de 40 ratos sacrificados após sete dias de administração das drogas, observou-se que: a) a administração de DS afetou significativamente o peso dos animais comparados com os ratos que receberam SF; b) não houve diferença significativa quando comparados os animais operados e não-operados; c) não houve interação significativa entre a droga e o tratamento cirúrgico instituído. Empregando-se o teste de Tukey, observou-se que

as médias das diferenças de peso foram significativamente menores nos animais tratados com DS, quando comparados com os que receberam SF (Tabela 13).

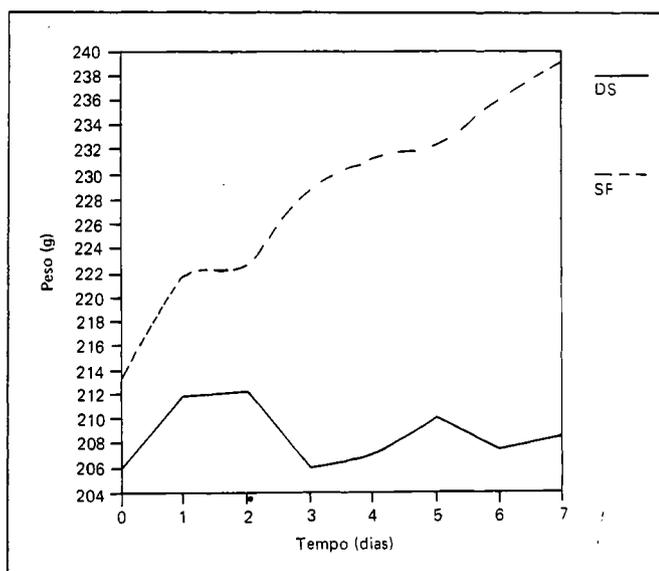


Fig. 2 - Peso dos animais não operados, segundo droga e tempo (grupo II).

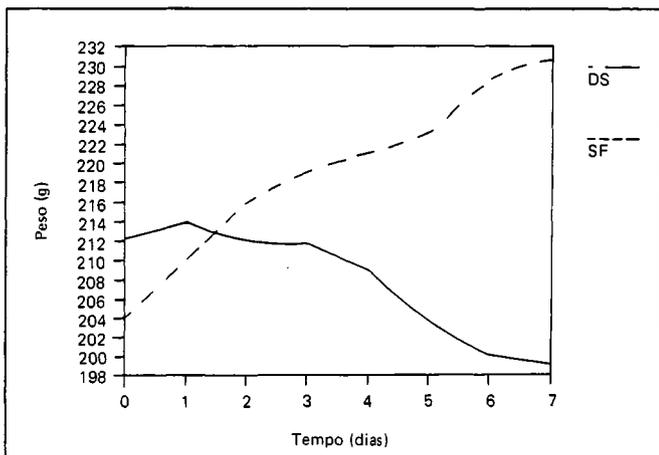


Fig. 3 - Peso dos animais não operados, segundo droga e tempo (grupo III).

Tabela 13 - Diferença de peso dos animais do grupo III, segundo subgrupo e droga (média e erro-padrão da média).

Droga	Subgrupo	
	Animais operados	Animais não operados
Soro fisiológico	26,80 ± 2,99	25,80 ± 2,71
Diclofenaco sódico	-12,90 ± 4,85	-0,10 ± 3,52

Teste de Tukey HSD
Valor crítico = 3,84
Valores calculados:

OP (SF x DS) = 10,97 (s)	SF (OP x NOP) = (ns)
NOP (SF x DS) = 7,15 (s)	DS (OP x NOP) = (ns)

Proteínas totais e frações

Pela análise de variância para as médias dos níveis de proteínas totais, albumina e globulinas, observou-se que: a) quando comparados os animais que receberam SF com os que receberam DS, houve diferença significativa entre as médias de todos os fatores analisados; b) quando comparados os animais operados com os não operados, houve diferença significativa entre as médias das proteínas totais e entre as médias das albuminas; c) não houve interação significativa entre os efeitos principais dos fatores analisados, quais sejam: drogas (SF ou DS) e tratamento (animais operados ou não operados). Empregando-se o teste de Tukey, observou-se que: a) os níveis médios de proteínas totais foram significativamente menores nos animais que receberam DS, quando comparados com os que receberam SF, tanto no grupo de animais operados como no dos não operados; b) quando analisado o efeito da cirurgia sobre os níveis de albumina, os ratos operados que receberam SF apresentaram níveis significativamente menores dessa proteína. Não houve diferença entre os animais que receberam DS; c) os níveis médios de globulinas foram menores nos animais que receberam DS, quando comparados com os que receberam SF, diferença essa significativa, tanto no grupo de animais operados como no dos não operados. O tratamento cirúrgico não afetou significativamente os níveis de globulinas (Tabela 14).

Tabela 14 - Níveis de proteínas totais, albumina e globulinas, segundo subgrupo (média e erro-padrão da média) (grupo III).

Subgrupo	Droga	Proteínas totais (g/dl)	Albumina (g/dl)	Globulinas (g/dl)
Operados	SF	6,43 ± 0,09	3,24 ± 0,05	3,19 ± 0,67
	DS	5,62 ± 0,15	3,03 ± 0,18	2,59 ± 0,09
Não operados	SF	6,92 ± 0,16	3,77 ± 0,10	3,15 ± 0,14
	DS	6,03 ± 0,16	3,40 ± 0,15	2,63 ± 0,11

Teste de Tukey HSD
Valor crítico = 3,84
Valores calculados:

Proteínas totais	Albumina	Globulinas
SF (OP x NOP) = 3,31 (ns)	SF (OP x NOP) = 3,91 (s)	SF (OP x NOP) = (ns)
DS (OP x NOP) = 2,77 (ns)	DS (OP x NOP) = 2,73 (ns)	DS (OP x NOP) = (ns)
OP (SF x DS) = 5,48 (s)	OP (SF x DS) = 1,55 (ns)	OP (SF x DS) = 5,32 (s)
NOP (SF x DS) = 6,02 (s)	NOP (SF x DS) = 2,73 (ns)	NOP (SF x DS) = 4,61 (s)

DISCUSSÃO

O diclofenaco sódico vem sendo amplamente empregado no pós-operatório imediato de cirurgias ou após traumatismos em geral, em função de sua ação analgésica, apesar de saber-se que os AINH retardam o processo de reparação tecidual ao alterarem a relação síntese-degradação de colágeno, através da inibição da biossíntese de prostaglandinas (13, 14).

Considerando, portanto, o potencial dessa droga de

exercer efeitos indesejáveis importantes para o sucesso do ato operatório, preocupamo-nos em estudar a sua ação sobre um procedimento cirúrgico padronizado em animais de experimentação.

Optamos por realizar o estudo no cólon ascendente, devido às facilidades técnicas. As secções e suturas foram realizadas sempre na mesma região (a 1,5 cm do ceco), já que estudos como o de Hawley e cols. (1970) (15) revelaram que a atividade da colagenase e conseqüente metabolismo do colágeno não são iguais nos diferentes segmentos do tubo digestivo.

No intuito de potencializar o efeito do DS, utilizamos dosagem diária de 10 mg/kg que, segundo Bruni e cols. (1980) (16), equivale à dose máxima utilizada no homem. Para a escolha da dosagem empregada no nosso protocolo, baseamo-nos em diversos outros trabalhos experimentais (10, 12, 13, 17), cujos autores empregaram doses equivalentes, as quais conferem à droga ação mais ampla, uma vez que, além de inibir a formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas, em função de sua ação sobre a enzima ciclooxigenase, o DS, em doses mais altas, também reduz a formação de produtos da lipoxigenase (ácido 5-hidroxicosatetraenóico -5 -HETE - e leucotrienos).

No que concerne aos achados observados no presente trabalho, quando comparados com os animais que receberam SF, os animais tratados com DS, independentemente do tempo de seguimento, apresentaram maior incidência de deiscências da incisão abdominal, de alterações intra-abdominais (como presença de fibrina e secreção de aspecto purulento) e de aderências intensas. Embora sem significância estatística, os animais tratados com DS apresentaram incidência acentuadamente maior (43,3%) de alterações da sutura cólica do que os animais que receberam SF (16,6%).

Enfatizando o efeito da droga estudada sobre a cicatrização (alterações da incisão abdominal e da sutura cólica), observamos que 21 animais operados e tratados com DS apresentaram pelo menos uma das alterações, enquanto essas ocorreram em apenas sete animais tratados com SF, o que se revelou significativo ao estudo estatístico. Essas alterações explicam a maior incidência de complicações inflamatórias e infecciosas e conseqüente elevada taxa de mortalidade nos animais operados e tratados com DS. Os animais que receberam a droga (grupos I e II) apresentaram índice de 12,5% de óbitos, enquanto não se observou tal evolução em nenhum dos animais tratados com SF. Vale ressaltar que os óbitos do grupo I (animais operados) ocorreram no quarto (dois óbitos) e no quinto (um óbito) dias de pós-operatório, tendo sido observadas, nesses animais, deiscências da sutura cólica, uma delas não bloqueada. Também foram tardios os dois óbitos do grupo II (animais não operados); não encontramos, contudo, qualquer causa que os pudesse justificar.

De modo a elucidar os mecanismos responsáveis pelas alterações cicatriciais, caracterizadas pelo aumento da incidência de deiscências e subseqüentes óbitos, analisa-

mos o componente essencial do processo cicatricial: o colágeno. Para tanto, avaliamos a concentração de hidroxiprolina na cicatriz da sutura cólica, e observamos que, quando analisado o conjunto de 60 ratos operados, aqueles que receberam DS apresentaram níveis significativamente mais baixos desse aminoácido. No entanto, não observamos um efeito significativo do fator tempo de exposição sobre a concentração de hidroxiprolina na sutura cólica.

O DS, como os AINH em geral, inibem a via da ciclooxigenase, provocando conseqüente redução na formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas (8, 9). Inibida a biossíntese das prostaglandinas, há um desequilíbrio no processo inflamatório, resultando em diminuição de colágeno. O fenômeno inverso também já foi demonstrado por Oliveira e cols. (1990) (18), que estudaram o efeito de misoprostol (prostaglandina sintética) sobre a cicatrização de anastomoses cólicas em ratos, verificando aumento significativo nos níveis de hidroxiprolina nos animais tratados com essa droga.

O DS em doses elevadas age, também, sobre a via da lipoxigenase, reduzindo a produção de ácido 5-hidroxicosatetraenóico (5-HETE) e leucotrienos (17, 19), substâncias essas já estabelecidas como potentes quimiotáticos de leucócitos (7, 20, 21-26).

Corroboram a hipótese de o DS ter agido sobre a fase inflamatória do processo de cicatrização trabalhos como o de Prandi Filho (1988) (10), que observou atenuação do processo inflamatório com diminuição do número de leucócitos e menor fibroplasia. Souza (1989) (11) verificou, igualmente, que o DS induziu a um atraso na resposta inflamatória e no início da proliferação fibroblástica.

Apesar de não termos verificado e avaliado diretamente a atividade da colagenase nas feridas cólicas em nossos animais, não descartamos a possibilidade de a diminuição dos níveis de hidroxiprolina após a administração de DS ser decorrente do aumento seletivo da atividade dessa enzima.

Observamos, também, que os animais tratados com DS apresentaram tendência a acentuada a progressiva perda ponderal, o que não foi verificado nos animais que receberam SF. Esses achados foram independentes de fatores relacionados ao ato operatório e às alterações endócrinas e metabólicas dele exclusivamente decorrentes, uma vez que ocorreram também nos animais não operados e tratados com DS.

Pode-se, assim, inferir que a perda ponderal nos animais tratados com a droga deva ter sido devida, entre outros possíveis mecanismos fisiopatológicos: a) aos seus efeitos sobre a ingesta, direta ou indiretamente relacionados ao sistema gastrointestinal; b) a possíveis efeitos endócrinos ou metabólicos diretos (pela redução dos processos anabólicos, pela acentuação dos processos catabólicos ou por ambos os mecanismos); c) a possíveis efeitos indiretos de intensificação do catabolismo, decorrente das complicações cirúrgicas e infecciosas relacionadas ao emprego da droga, hipótese essa que, entretanto, não se aplica aos animais não operados.

Os ratos que receberam DS apresentaram queda significativa dos níveis médios de proteínas totais, comparados com os que receberam SF. Do mesmo modo, a análise das frações protéicas mostrou que tanto os níveis de albumina como os de globulinas foram menores nos animais tratados com a droga. Essa diferença, contudo, só foi estatisticamente significativa para os níveis de albumina, entre os animais sacrificados no terceiro dia de pós-operatório. Esse fenômeno ocorreu no pico da resposta inflamatória, o que pode ter implicações etiopatogênicas. Uma hipótese possível refere-se ao aumento da permeabilidade capilar, com saída da albumina do espaço intravascular para o interstício. Apesar de o aumento da permeabilidade vascular ser favorecido pela ação das prostaglandinas (25, 27) e ser antagonizado por drogas que inibem a sua biossíntese, como é o caso do DS, os animais tratados com o antiinflamatório apresentaram maior incidência de alterações cicatríciais e conseqüente reação inflamatória mais intensa.

Ainda resta a hipótese de a droga ter induzido diminuição de síntese ou aumento de degradação protéica, em função de eventuais efeitos hepáticos. Embora raros, já foram relatados casos clínicos de hepatopatias graves associadas ao uso do diclofenaco sódico (28).

É possível ainda que a gênese do fenômeno observado em nosso experimento seja resultado da combinação dos fatores anteriormente citados.

O aumento progressivo durante o período de observação notado nos níveis plasmáticos de globulina em todos os animais operados pode ter decorrido tanto do trauma cirúrgico como de reações inflamatórias da fase aguda.

Nos animais que receberam a droga, houve queda significativa dos níveis plasmáticos de globulina, com relação aos animais tratados com SF, o que talvez tenha ocorrido pelo próprio efeito antiinflamatório da droga, não havendo influência do ato cirúrgico nesses achados, visto que foram observados tanto nos animais operados como nos não operados.

CONCLUSÕES

À análise dos resultados observados, encontramos: 1) que a concentração de hidroxiprolina na sutura cólica foi menor nos animais operados tratados com DS, quando comparados com os que receberam SF; 2) que os animais operados e tratados com DS apresentaram maior incidência de complicações da cicatrização, a saber: maior ocorrência de deiscências da incisão abdominal (53,3%), maior frequência de alterações na cavidade abdominal (43,3%), maior incidência de aderências intensas (60%), maior frequência de alterações na sutura cólica (43,3%). Além disso, observaram-se 12,5% de óbitos entre os animais tratados contra nenhum óbito nos grupos de controle; 3) que os animais tratados com DS (operados e não operados) não apresentaram ganho de peso durante o período de estudo, quando comparados aos animais que receberam SF; 4) que os animais tratados com DS apresentaram

menores níveis plasmáticos médios de proteínas totais e frações.

Os resultados deste experimento sugerem que o uso de DS em pós-operatório, sobretudo em casos de suturas intestinais, deva merecer estudos clínicos cuidadosos, uma vez que, sob as nossas condições de investigação, poderão ser observados efeitos adversos e potencialmente graves, se vierem a ocorrer em pacientes operados. A necessidade desses estudos é reforçada pela frequência com que essa droga vem sendo utilizada na prática cirúrgica atual.

CALACHE NETO JE, AUN F, YOUNES RN - Effects of diclofenac sodium administration on colonic sutures in rats.

SUMMARY: The effects of diclofenac sodium on the healing of colonic sutures in rats were observed in an experimental model consisting of the section followed by suturing of the ascending colon. Sixty rats (group I) were submitted to the surgical procedure and to the administration of diclofenac sodium (10 mg/kg/day) or of saline solution and sacrificed following different periods of time (three, five and seven days). Other 30 control rats (group II), that received the drug (10 mg/kg/day), saline solution or with no treatment (standard group) were observed. Finally, the results achieved with the administration of the drug were compared among operated and not operated animals (group III). The gross surgical findings, the weight changes, plasma levels of total proteins and fractions, hemoglobin and hematocrit levels and the hydroxiprolin concentration at the sutures line were observed in the rats submitted to the surgical procedure. The control rats were submitted to the same observations, except for the surgical findings. It was observed that diclofenac sodium can interfere with the healing mechanism, since: a) there was a higher incidence of dehiscence of abdominal incisions (53.3%) and changes in colonic sutures (43.3%) in the animals given diclofenac sodium; b) 12.5% of the animals given diclofenac sodium died, while no animal of the control group evolved to death; c) there was no weight increase among diclofenac sodium-treated animals; d) there was a decrease of plasmatic levels of total proteins and fractions and the levels of hydroxiprolin in the sutures line in the rats submitted to the surgical procedure.

KEY WORDS: colonic healing; colon, surgery; colonic sutures, adverse effects; diclofenac sodium

REFERÊNCIAS

1. Hawley PR. Causes and prevention of colonic anastomosis breakdown. *Dis Colon Rectum* 1973; 16: 272-7.
2. Demetriades D, Lawson HH, Sofianos C, Oosthuizen MML, Kurstjens S,

- Frolich J. Healing of the right and left colon. An experimental study. *S Afr Med J* 1988; 73: 657-8.
3. Everett WG. Sutures, incisions, and anastomoses. *Ann R Coll Surg Engl* 1974; 55: 31-8.
 4. Jibom H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. Bursting strenght of the colon after left colon resection and anastomoses. *Am J Surg* 1978; 136: 587-94.
 5. Carrico TJ, Mehrhof Jr. AI, Cohen IK. Biology of wound healing. *Surg Clin North Am* 1984; 64: 721-33.
 6. Ku EC, Wasvary JM, Cash WD. Diclofenac sodium (GP 45840, Voltaren). A potent inhibitor of prostaglandin synthetase. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 641-3.
 7. Diegelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast Reconstr Surg* 1981; 68: 107-13.
 8. Sacchetti G, Bruni G. Agentes antiinflamatórios não esteróides. Um breve resumo de sua classificação, modo de ação e avaliação clínica. *Rev Bras Reumat* 1981; 21: 205-14.
 9. Velasco M, Guaitero E. A comparative study of some anti-inflammatory drugs in wound healing of the rat. *Experientia* 1973; 29: 1250-1.
 10. Prandi Filho W. Aspectos morfológicos e morfométricos do processo inflamatório provocado por fio de algodão no subcutâneo de ratos tratados com DS. São Paulo, 1988: 52. (Tese de Mestrado da Escola Paulista de Medicina).
 11. Sousa JB de. Estudo da cicatrização em anastomoses no intestino delgado de coelhos tratados com DS. Ribeirão Preto, 1989: 106. (Tese de Mestrado da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP).
 12. Scholer DW, Ku EC, Boettcher I, Schweizer A. Pharmacology of diclofenac sodium. *Am J Med* 1986; 80(Suppl. 4B): 34-8.
 13. Menassé R, Hedwall PR, Kraetz K, Jaques R, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, Ziel R. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol* 1978; (Suppl. 22): 5-16.
 14. Robinson DR. Management of gastrointestinal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs during the therapy of rheumatic diseases: the rheumatologist's perspective. *Am J Med* 1988; 84(Suppl. 2A): 1-4.
 15. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK, Dunphy JE. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. *Br J Surg* 1970; 57: 896-920.
 16. Bruni G, Dal PRA P, Dotti MT, Segre G. Effect of various antiinflammatory drugs on plasma ACTH and cortisol levels in rats. *Pharmacol Res* 1980; 12: 349-57.
 17. Ku E, Lee W, Kothari HV, Scholer DW. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med* 1986; 80(Suppl. 4B): 18-23.
 18. Oliveira PG, Vianna AL, Aprilli F. Effects of a synthetic prostaglandin the misoprostol, upon the healing of colonic anastomoses in rats. XXVII World Congress of the International College of Surgeons. Abstracts. São Paulo, 1990; 99: 434.
 19. Perianan A, Gougerot-Pocidalo MA, Giroud JP, Hakin J. Diclofenac sodium, a negative chemokinetic factor for neutrophilocomotion. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 3433-8.
 20. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78: 71-100.
 21. Leibovich SJ, Ross R. A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblast *in vitro*. *Am J Pathol* 1976; 84: 501-13.
 22. Shoshan S. Wound healing. *Int Rev Connective Tissue Res* 1981; 9: 1 - 26.
 23. Becker EL. Chemotatic factors of inflammation. *TIPS*: 1983: 223-5.
 24. Lundberg C, Gerdin B. The inflammatory reaction in an experimental model of open wounds in the rat. The effect of arachidonic acid metabolites. *Eur J Pharmacol* 1984; 97: 229-38.
 25. Malmsten CL. Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes in inflammation. *Am J Med* 1986; 80(Suppl. 4B): 11-7.
 26. Todd PA, Sorkin EM. Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1988; 35: 244-85.
 27. Wilson DE. Prostaglandinas: o ponto crítico. Prostaglandin digest (special issue), 1985.
 28. Breen EG, McNicholl J, Cosgrove E, McCabe J, Stevens FM. Fatal hepatitis associated with diclofenac. *Gut* 1986; 27: 1390-3.

Endereço para correspondência:

João Elias Calache Neto
Rua Peixoto Gomide, 379/700
01409-000 - São Paulo - SP