

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

MARCELLA GOETZ MORO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GÁSTRICO E RENAL DE ANTI-
INFLAMATÓRIO SELETIVO E NÃO SELETIVO PARA COX-2 EM RATOS
SUBMETIDOS À BAIXA DOSE DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO**

**PONTA GROSSA
2015**

MARCELLA GOETZ MORO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GÁSTRICO E RENAL DE ANTI-
INFLAMATÓRIO SELETIVO E NÃO SELETIVO PARA COX-2 EM RATOS
SUBMETIDOS À BAIXA DOSE DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO**

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre na
Universidade Estadual de Ponta
Grossa, no curso de Mestrado em
Odontologia – Área de concentração
em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar
Nobre Franco

Co-Orientadora: Profa. Dra. Márcia
Thaís Pochapski

**PONTA GROSSA
2015**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Moro, Marcella Goetz
M867 Avaliação dos efeitos gástrico e renal
de anti-inflamatório seletivo e não
seletivo para COX-2 em ratos submetidos à
baixa dose de ácido acetilsalicílico/
Marcella Goetz Moro. Ponta Grossa, 2015.
61f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia -
Área de Concentração: Clínica Integrada),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar
Nobre Franco.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Márcia Thaís
Pochapski.

1. Anti-Inflamatórios não Esteroides.
2. Ácido Acetilsalicílico. 3. Gastrite.
4. Rim. 5. Ratos. I. Franco, Gilson Cesar
Nobre. II. Pochapski, Márcia Thaís. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Odontologia. IV. T.

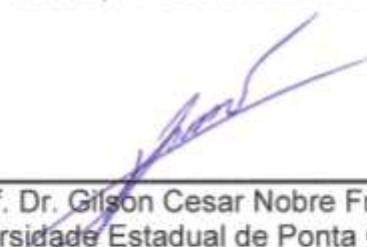
CDD: 617.6

MARCELLA GOETZ MORO


**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GÁSTRICO E RENAL DE ANTI-
INFLAMATÓRIO SELETIVO E NÃO SELETIVO PARA COX-2 EM RATOS
SUBMETIDOS À BAIXA DOSE DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

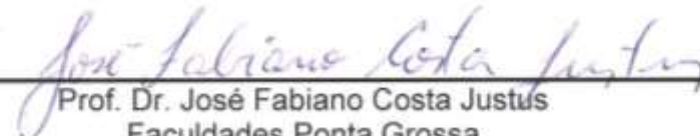
Ponta Grossa, 17 de Dezembro de 2015.



Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Fabiana Postiglione Mansani
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. José Fabiano Costa Justus
Faculdades Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada é possível.

À minha família, pelo incentivo e apoio dado durante esta trajetória, fazendo com que o caminho percorrido tenha se tornado mais fácil.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco, o qual foi de fundamental importância para que esse trabalho existisse. Agradeço à sua atenção e disposição em tempo integral, além da transmissão de todo o conhecimento e experiência.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Márcia Thaís Pochapski, por toda a orientação dada.

Ao Prof. Dr. Sinvaldo Baglie, por toda a ajuda e disponibilidade no decorrer da pesquisa.

Ao meu namorado Gustavo Rezende Trevizoli, pelo apoio e incentivo em cada passo dado, além de toda a paciência por ele concedida em diferentes momentos.

À Paula Katherine Vargas Sanchez, pela amizade e companheirismo durante o desenvolvimento e execução desse trabalho.

Às meninas do grupo de pesquisa, por toda a ajuda, disposição e incentivo dado durante a pesquisa.

DADOS CURRICULARES

Marcella Goetz Moro

NASCIMENTO 23.08.1991	PONTA GROSSA – PARANÁ – BRASIL
FILIAÇÃO	Nestor Silva Moro Evelise Goetz Moro
2009 – 2013	Curso de Graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – Brasil.
2014 – 2016	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, nível de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada.

RESUMO

Com o aumento mundial do consumo da baixa dose de aspirina (BDA) para prevenção de doenças cardiovasculares, torna-se cada vez mais frequente o atendimento odontológico de pacientes usuários crônicos desta terapêutica que necessitam de medicação anti-inflamatória complementar de forma aguda. Considerando que a literatura é escassa em trabalhos que avaliem esta interação, o objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos gástricos e renais que a interação da BDA com um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) (Ibuprofeno) e um coxibe (Etoricoxibe) pode ocasionar. Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8 animais/grupo) e submetidos ao uso prolongado (42 dias) de BDA e posterior interação com AINE seletivo e não seletivo para COX-2 durante 3 dias pelo método da gavagem (Grupos: 1-Carboximetilcelulose – CMC; 2-BDA; 3-BDA+Ibuprofeno; 4-Ibuprofeno; 5-BDA+Etoricoxibe; 6-Etoricoxibe). Após período experimental, foram realizadas avaliações de lesão gástrica e renal (macroscopia) e quantificação sérica de creatinina (função renal). Embora os resultados tenham demonstrado que os grupos Ibuprofeno, BDA+Ibuprofeno e BDA+Etoricoxibe apresentaram lesão gástrica estatisticamente significativa em relação ao grupo CMC (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$), ao serem comparados entre si, observou-se uma maior extensão desta lesão para os grupos em que ocorreu a interação com BDA. No sistema renal, nenhum fármaco/interação provocou alteração significativa ($p > 0,05$). Conclui-se que as maiores porcentagens de lesão gástrica foram observadas quando do uso prolongado da BDA em associação com um AINE não seletivo e com um coxibe. Por outro lado, nenhum grupo foi capaz de provocar alteração significativa sobre o tecido e função renal.

Palavras-chave: Anti-Inflamatórios não Esteroides; Ácido Acetilsalicílico; Gastrite; Rim; Ratos.

ABSTRACT

The worldwide increase in consumption of low-dose aspirin (LDA) for preventing cardiovascular diseases has raised the frequency of patients seeking dental treatment who are chronic users of such an approach and require complementary acute anti-inflammatory medication. Considering the lack of literature evaluating this interaction, this study aims to analyze the possibility of gastric and renal effects caused by the use, in conjunction, of LDA, a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that is Ibuprofen, and a coxib (Etoricoxib). Male Wistar rats were divided into 6 experimental groups (n=8 animals/group) and submitted to prolonged (42 days) use of LDA and posterior interaction with COX-2-selective or non-selective NSAIDs during 3 days by gavage (groups: 1-Carboxymethyl cellulose – CMC; 2-LDA; 3-LDA+Ibuprofen; 4-Ibuprofen; 5-LDA+Etoricoxib; 6-Etoricoxib). After the experimental period, analyses of gastric and renal damage (macroscopy) and quantification of serum creatinine (renal function) were done. Although the results have demonstrated that the Ibuprofen, LDA+Ibuprofen, and LDA+Etoricoxib groups presented statistically significant gastric damage in relation to the CMC group (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$), when compared among one another, there was a visible increased extension of the lesion in the groups that interacted with LDA. Concerning the renal system, no drug/interaction has provoked any significant alteration ($p > 0.05$). It is concluded that the biggest percentages of gastric lesion were observed as stemming from the prolonged use of LDA in association with a non-selective NSAID, and with a coxib. Alternatively, no group was capable of provoking significant alteration upon renal function and tissue.

Key-words: Anti-inflammatory Agents, Non-Steroidal; Aspirin; Gastritis; Kidney; Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Biossíntese de prostanóides a partir do ácido araquidônico	17
Figura 2. Estrutura e componentes das isoformas COX-1 e COX-2	19
Figura 3. Funções das isoformas COX-1 e COX-2 no sistema gástrico.....	21
Figura 4. Esquema representativo da ativação e funcionamento do sistema renina-angiotensina-aldosterona	24
Figura 5. Acetilação do ácido salicílico para ácido acetilsalicílico	28
Figura 6. Acetilação da COX-1 na posição serina 530.....	30
Figura 7. Representação do estudo	34
Figura 8. a) Mensuração da área total do estômago, em mm ² e; b) Mensuração da área da lesão encontrada, em mm ²	35
Figura 9. Anatomia renal (região medular e cortical) - Avaliação da presença ou ausência de edema, focos hemorrágicos e necrose tubular	36
Figura 10. Porcentagem de lesão gástrica encontrada nos diferentes grupos. 38	
Figura 11. Análise macroscópica gástrica.....	39
Figura 12. Manutenção da estrutura renal	40
Figura 13. Valores em mg/dL de creatinina no soro sanguíneo	40
Figura 14. Representação esquemática dos resultados encontrados em consequência do bloqueio das diferentes isoformas da ciclooxigenase com o uso isolado de Ibuprofeno e Etoricoxibe ou em associação com a BDA.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão dos grupos de pesquisa de acordo com as soluções e terapias utilizadas.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Hormônio antidiurético ou vasopressina
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANOVA	Análise de variância
AMP cíclico	Monofosfato cíclico de adenosina
Arg	Arginina
BDA	Baixa dose de ácido acetilsalicílico
CCAC	Canadian Council on Animal Care
CEUA	Comissão de Ética do uso de Animal
CMC	Carboximetilcelulose de sódio
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
DCV	Doença Cardiovascular
d de Cohen	Tamanho do efeito
dL	Decilitro
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
Eto	Etoricoxibe
g	Gramas
H&E	Hematoxilina e Eosina
His	Histidina
Ibu	Ibuprofeno
IC ₅₀	Concentração necessária de fármaco para inibir a atividade de uma enzima em 50%
Ile	Isoleucina
IP	Intraperitoneal
kD	QuiloDaltons
kg	Quilograma
Leu	Leucina
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mm ²	Milímetro quadrado
n	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra, sob hipótese nula
Cr	Creatinina no Soro
PG	Prostaglandina
PGI ₂	Prostaciclina
Phe	Fenilalanina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
rpm	Rotações por minuto
TFG	Taxa de Filtração Glomerular

Tyr
TXA₂
UEPG
Val
µg
µm

Tirosina
Tromboxano A₂
Universidade Estadual de Ponta Grossa
Valina
Micrograma
Micrometro

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
↑	Aumento
>	Maior que
<	Menor que
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	CICLOOXIGENASE	15
2.2	CICLOOXIGENASE E OS SISTEMAS GÁSTRICO E RENAL	20
2.2.1	Sistema Gástrico	20
2.2.2	Sistema Renal	22
2.3	ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS – INTERAÇÕES	24
2.4	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	27
3	PROPOSIÇÃO	31
3.1	PROPOSIÇÃO GERAL	31
3.2	PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA	31
4	MATERIAIS E MÉTODO	32
4.1	PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO (CÁLCULO AMOSTRAL)	32
4.2	ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO	32
4.3	FÁRMACOS UTILIZADOS NO ESTUDO	32
4.4	DIVISÃO DOS GRUPOS, ADMINISTRAÇÃO DOS TRATAMENTOS E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	33
4.5	AVALIAÇÃO DOS DANOS GÁSTRICOS	35
4.5.1	Avaliação macroscópica	35
4.6	AVALIAÇÃO DOS DANOS E FUNÇÃO RENAL	35
4.6.1	Avaliação macroscópica	35
4.6.2	Avaliação da função renal	36
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS	38
5.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA GÁSTRICA	38
5.2	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA RENAL	39
5.3	DETERMINAÇÃO CREATININA SÉRICA	40
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÃO	45
8	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO A	60

1 INTRODUÇÃO

Na Odontologia, o atendimento de pacientes usuários crônicos de baixa dose de aspirina (BDA) tem aumentado consideravelmente em decorrência de sua grande eficácia na prevenção de eventos cardiovasculares, uma vez que a mesma atua inibindo a agregação plaquetária por meio do bloqueio da isoforma da enzima ciclooxigenase (COX), denominada de COX-1 (Shiotani et al.¹ 2010). Neste sentido, tem se tornado cada vez mais frequente a prescrição de uma medicação anti-inflamatória, por um curto período de tempo, em razão de um procedimento cirúrgico ou uma condição patológica para um paciente já submetido ao uso de BDA (Kwiecien et al.² 2015).

Como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm seu mecanismo de ação baseado no bloqueio competitivo da COX, podem ser classificados em AINEs não seletivos, que vão atuar sobre COX-1 e COX-2 (ex. Ibuprofeno), ou então em coxibes, grupo altamente seletivo para isoforma COX-2 (ex. Etoricoxibe) (Dubois et al.³ 2004).

A COX-1, caracterizada como constitutiva, é responsável pela homeostasia dos órgãos e tecidos, tendo importante papel na mucosa gástrica por meio do aumento da produção de muco e inibição da secreção de ácidos (Takeeda et al.⁴ 2004), além da sua atuação no sistema renal, assegurando a manutenção de adequado fluxo sanguíneo (Batlouni⁵ 2010). Por outro lado, a COX-2, considerada principalmente patológica, é expressa, em menor proporção, de forma constitutiva em alguns órgãos, como no sistema renal, por exemplo, onde é responsável por manter uma adequada taxa de filtração glomerular, além de controlar a pressão sanguínea por meio da modulação fisiológica do tônus vascular e equilíbrio hídrico dos rins (Wang et al.⁶ 2014). Além disso, na mucosa gástrica, promove a cicatrização de injúrias na presença de inflamação prévia (Takeeda et al.⁴ 2004).

Assim, estudos afirmam que, ao ser feita a inibição dessas isoformas pelo uso de AINEs, seletivos ou não para COX-2, estes podem vir a ser responsáveis pela formação de injúrias gástricas leves. Porém, ao fazer a

associação dos mesmos, a lesão é intensificada, constatando assim que, para ocorrência de uma alteração significativa, é necessária não somente a inibição de COX-1, mas também a de COX-2 (Amer et al.⁷ 2010, Zinkievich et al.⁸ 2010). Em relação à função renal, o uso de diferentes AINEs, isolados ou em combinação, pode ser responsável por desencadear alterações renais, como fibrose e necrose, aumento dos níveis de creatinina sérica, além da retenção de sódio e água (Inal et al.⁹ 2014, Ungprasert et al.¹⁰ 2015, Wallace et al.¹¹ 2000).

Na atualidade, embora existam trabalhos que relatem as consequências gástricas e renais do uso isolado ou da interação entre AINEs seletivos e/ou não seletivos para COX-2, não há nenhum estudo na literatura que avalie o efeito do uso agudo destes medicamentos quando do uso crônico da BDA.

Deste modo, na busca de uma terapêutica clínica mais segura, esse trabalho teve como objetivo quantificar as lesões macroscópicas gástricas e renais, além de avaliar a função dos rins por meio da dosagem de creatinina sérica na ocorrência da interação de BDA com um AINE não seletivo (Ibuprofeno) e com um coxibe (Etoricoxibe).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CICLOOXIGENASE

A enzima ciclooxigenase (COX), identificada há mais de 30 anos, recebeu esse nome devido ao seu mecanismo de ação estar baseado na formação de peróxidos bicíclicos (endoperóxidos) provenientes da oxigenação de ácidos graxos polinsaturados (Vane¹² 1971, Marnett et al.¹³ 1999). No entanto, antes mesmo de sua descoberta, as prostaglandinas (PGs) já haviam sido estudadas, a partir de 1930, por meio de observações de sêmen fresco, até então responsável pela contração rítmica do miométrio humano, além de apresentar propriedades vasodepressoras. Porém, devido à sua instabilidade e baixas concentrações, apenas em 1960 ficou documentado que as PGs são produtos de ácidos graxos livres provenientes do ácido araquidônico presente em todas as membranas celulares (Vane¹² 1971, Marnett et al.¹³ 1999). Por fim, com a realização de um isolamento e caracterização de intermediários biologicamente ativos da PG (PGG₂ e PGH₂), além de suas formas especializadas, Bergstrom, Samuelsson e Vane identificaram o seu mecanismo de biossíntese e foram condecorados com o Prêmio Nobel de biologia e medicina em 1982 (Miller¹⁴ 2006).

O ácido araquidônico é um ácido graxo de 20 carbonos presente na bicamada de fosfolipídios de membrana das células do organismo sob a forma de araquidonato e, devido a diferentes estímulos, como químico, inflamatório, traumático, mitogênico, sofre ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). Assim, com a liberação do mesmo, ocorre sua conversão por meio da prostaglandina G/H sintase citosólica, denominada de ciclooxigenase (COX), em PGG₂ e PGH₂ (Patrono e Baigent¹⁵ 2009). Essa prostaglandina G/H sintase apresenta o sítio ciclooxigenase e sítio peroxidase como sítios catalíticos. O primeiro sítio converte o ácido araquidônico em PGG₂, a qual sofre ação da enzima peroxidase e é reduzida ao intermediário instável, a prostaglandina H₂ (PGH₂), responsável direta pela formação das diferentes formas de prostanóides por

meio da sua conversão pelas isomerases tissulares específicas (Figura 1) (Rimon et al.¹⁶ 2010, Kirkby et al.¹⁷ 2013, Kummer e Coelho¹⁸ 2002, Patrignani e Patrono¹⁹ 2015).

Os prostanóides pertencem a uma família de lipídios bioativos e encontram-se no grupo dos eicosanóides juntamente com os leucotrienos provenientes da via lipooxigenase, a qual tem extrema importância nos casos de hipersensibilidade, alergia e inflamação (Miller¹⁴ 2006). Os prostanóides consistem em quatro tipos de prostaglandinas (PGs) e um de tromboxano (TX): PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ (prostaciclina) e TXA₂. As primeiras são moléculas formadas por uma estrutura básica de ácido prostanóico constituído por um anel de ciclopentano e duas cadeias de carbono; por outro lado, o tromboxano contém dois átomos de oxigênio em uma estrutura de anel (Figura 1) (Patrignani e Patrono¹⁹ 2015, Kawahara et al.²⁰ 2015, Aldrovandi et al.²¹ 2013).

Esses prostanóides interagem com receptores específicos da superfamília dos receptores acoplados a proteína G nas membranas celulares. Neste sentido, conforme o tecido e o tipo celular envolvido no processo, esses mediadores terão uma diferente atuação no organismo. Como por exemplo, a PGF_{2α}, sintetizada a partir da PGE₂, aumenta a vasoconstrição, a broncoconstrição e a contração da musculatura lisa, enquanto a PGD₂ irá promover vasodilatação e estimulação de nociceptores. A prostaciclina produzida pelas células endoteliais terá como função inibir a agregação plaquetária e promover vasodilatação arterial. Por fim, o TXA₂ produzido pelas plaquetas terá efeito vasoconstritor e estimulador da agregação plaquetária (Patrignani e Patrono¹⁹ 2015, Camargo et al.²² 2007).

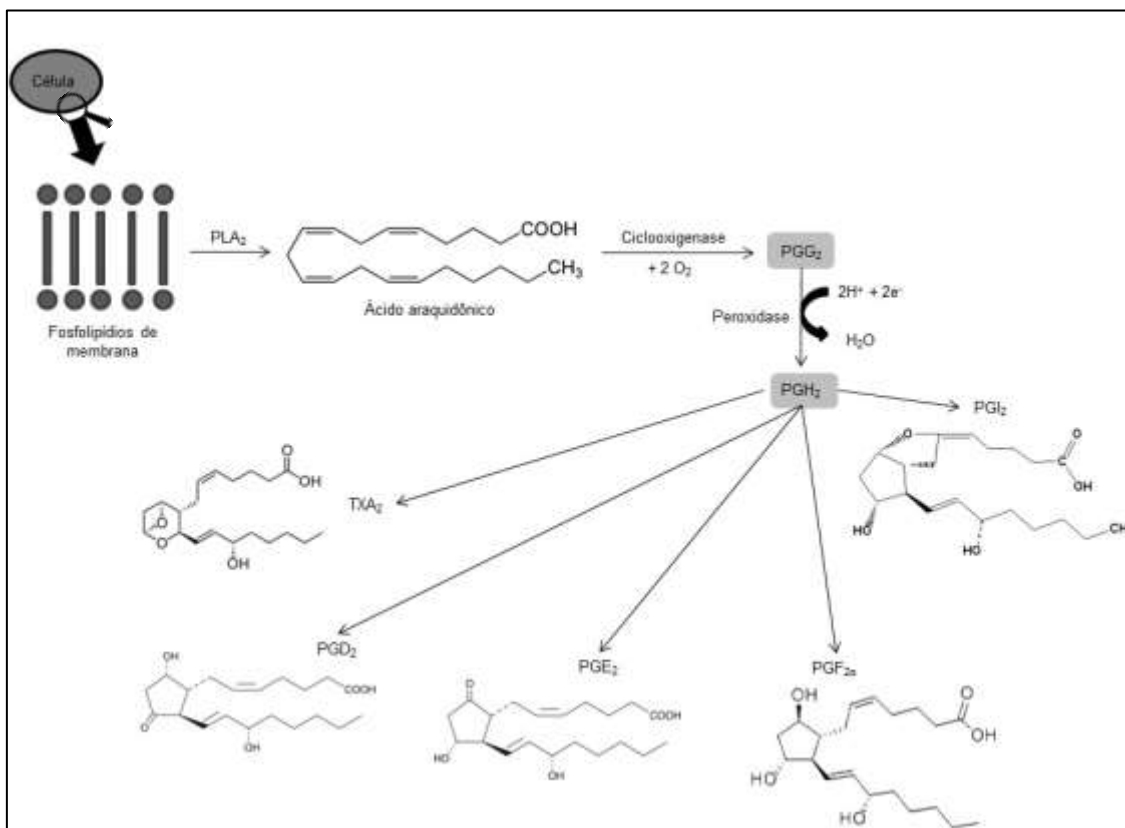


Figura 1. Biossíntese de prostanóides a partir do ácido araquidônico (Kawahara et al.²⁰ 2015, adaptado)

Nos dias atuais, admite-se a existência de diferentes isoformas para COX, cada uma com suas funções específicas, sendo COX-1 e COX-2 as mais caracterizadas (Akyazi et al.²³ 2013, Palkar et al.²⁴ 2014).

A COX-1, expressa principalmente na forma constitutiva ou fisiológica, é encontrada na maioria dos tecidos normais e, conseqüentemente, responsável pela produção de prostanóides cujo objetivo é manter as funções fisiológicas normais, além da hemostasia e integridade dos tecidos (Kirkby et al.¹⁷ 2013, Troxler et al.²⁵ 2007, Lim et al.²⁶ 2013). Ou seja, deve manter a taxa basal de biossíntese de prostanóides no corpo e, se necessário, proporcionar um rápido aumento, mas de curta duração (Patrignani e Patrono¹⁹ 2015).

Dessa forma, são responsáveis pela regulação dos processos celulares normais, atuando na citoproteção gástrica, com a produção de muco protetor gástrico e inibição da secreção gástrica, além de manterem a homeostase

vascular e renal, e induzir a agregação plaquetária (Shiotani et al.¹ 2010, Kummer e Coelho¹⁸ 2002). Na presença de um quadro inflamatório, sua atividade permanece inalterada ou pode vir a ter um aumento discreto de 2 a 4 vezes (Dubois et al.³ 2004, Kummer e Coelho¹⁸ 2002, FitzGerald e Patrono²⁷ 2001).

Em contrapartida e de forma interessante, estudos recentes afirmam que prostanóides provenientes da COX-1 podem também participar do processo inflamatório em sua fase aguda, tendo seu papel na fase inicial ou precoce da mesma (Chen et al.²⁸ 2013, Smyth et al.²⁹ 2009, Peskar et al.³⁰ 2001, Harris e Breyer³¹ 2001, Rouzer et al.³² 2004, Chen et al.³³ 2008).

Por outro lado, a COX-2, considerada inicialmente patológica ou induzida devido a sua produção ser consideravelmente aumentada aproximadamente 20 vezes na presença de estímulos inflamatórios ou trauma tissular, é responsável pela produção de prostanóides que controlam as respostas relacionadas à dor (sensibilização de nociceptores) e inflamação (eventos celulares e vasculares) (Kirkby et al.¹⁷ 2013). Assim, participam da ativação de mastócitos, macrófagos e células endoteliais (Brune e Hinz³⁴ 2004). Apesar disso, atualmente sabe-se que ela é encontrada constitutivamente em alguns tecidos, com a formação de prostanóides relacionados com a homeostase de diferentes órgãos e sistemas (Kummer e Coelho¹⁸ 2002, Akyazi et al.²³ 2013, Cairns³⁵ 2007, Barudzic et al.³⁶ 2013, Murtaza et al.³⁷ 2014, Kovacs et al.³⁸ 2014).

Essas isoformas são 60% homólogas com peso molecular aproximado de 70kD (quiloDaltons), estando as estruturas tridimensionais quase sobreponíveis (Schonbeck et al.³⁹ 1999). A COX-1 possui 576 aminoácidos e a COX-2, 587 (Picot e Garavito⁴⁰ 1994, Kurumbail et al.⁴¹ 1996). E, apesar do fato de ambas metabolizarem a mesma cascata do ácido araquidônico, apresentam uma sequência genética diferente (genes regulados por diferentes sistemas independentes). Os genes da COX-1 e COX-2 estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente (Brune e Hinz³⁴ 2004).

Cada isoenzima é composta pelo domínio fator de crescimento epidérmico (resíduos 34 – 72), domínio de ligação à membrana (resíduos 73 – 116), e domínio catalítico, formando a maior parte da proteína, o qual contém o sítio ativo da COX e da peroxidase em ambos os lados do grupo prostético heme (Rouzer e Marnett⁴² 2009). Os resíduos altamente conservados Arg120 e Tyr355 estão presentes em ambas as isoformas. No entanto, Phe503, His513 e Ile523 presentes na COX-1 são substituídos por Leu503 (menos volumoso), Arg513 e Val523 presentes na COX-2, respectivamente (Flower⁴³ 2003). Este último será o responsável pela abertura do bolso lateral hidrofóbico, fazendo com que o sítio de ligação da COX-2 seja 25% maior que o da COX-1, e também apresente um local de ligação secundário, fato esse que permite que agentes bloqueiem especificamente a atividade da isoforma COX-2 utilizando concentrações com mínimo efeito sobre COX-1 (Figura 2) (Lipsky⁴⁴ 2000).

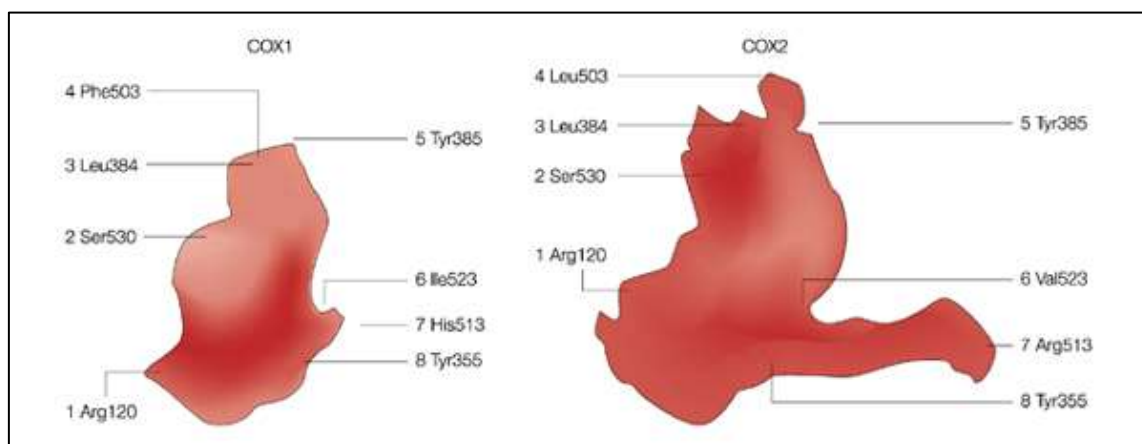


Figura 2. Estrutura e componentes das isoformas COX-1 e COX-2 (Flower⁴³ 2003)

Uma terceira isoforma, a COX-3, foi recentemente identificada. Porém, diferentemente das outras isoformas responsáveis pela produção de prostanoídes pró-inflamatórios, essa seria responsável por produzir substâncias anti-inflamatórias, explicando o porquê da ocorrência de períodos de remissão em doenças inflamatórias crônicas (Willoughby et al.⁴⁵ 2000).

2.2 CICLOOXIGENASE E OS SISTEMAS GÁSTRICO E RENAL

As prostaglandinas produzidas pelas isoenzimas da COX (COX-1 e COX-2) estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos e patológicos no organismo, destacando-se na manutenção da homeostasia do estômago e rins (Takeeda et al.⁴ 2004, Hilario et al.⁴⁶ 2006, Carvalho et al.⁴⁷ 2004).

2.2.1 Sistema Gástrico

No estômago, as prostaglandinas citoprotetoras (PGI₂ e PGE₂) provenientes da COX-1 (expressa de maneira constitutiva na mucosa gástrica normal) são responsáveis pela manutenção da arquitetura glandular do estômago e diferentes funções fisiológicas (Takeeda et al.⁴ 2004, Kummer e Coelho¹⁸ 2002). Dentre essas funções destacam-se: inibição da secreção de ácido; inibição da formação de AMP cíclico estimulado por histamina; redução do volume de secreção, acidez e conteúdo de pepsina; proliferação de células epiteliais; estimulação da secreção de água e eletrólitos para o jejuno; indução da produção de muco; aumento de fluxo sanguíneo da mucosa por serem vasodilatadoras; síntese de glutathione e, dessa forma, aumento da capacidade de eliminação de radicais livres; além do aumento da síntese de bicarbonato (Takeeda et al.⁴ 2004, Miller¹⁴ 2006, Kummer e Coelho¹⁸ 2002, Cairns³⁵ 2007, Hilario et al.⁴⁶ 2006, Carvalho et al.⁴⁷ 2004, Cryer e Mahaffey⁴⁸ 2014, Konturek et al.⁴⁹ 2005).

Em menor quantidade, podem, também, atuar no processo de defesa da mucosa gástrica previamente inflamada (Takeeda et al.⁴ 2004). Como essas prostaglandinas ajudam a manter a integridade da mucosa do estômago, além de protegerem as células epiteliais, o bloqueio ou inibição da COX-1 poderá desencadear úlceras, lesões gastrointestinais e outras complicações mais graves, como hemorragia, perfuração e estenose (estreitamento anormal de um vaso sanguíneo) (Lim et al.²⁶ 2013, Carvalho et al.⁴⁷ 2004, Filaretova et al.⁵⁰

2011). Sangramentos podem ocorrer também devido à inibição da atividade plaquetária por meio do bloqueio do TXA₂ (Kummer e Coelho¹⁸ 2002).

Ao contrário da COX-1, a maior expressão de COX-2 se dará na presença de inflamação, infecções, úlceras gástricas já formadas, ou algum estímulo irritante local (Takeeda et al.⁴ 2004). Dessa forma, as prostaglandinas provenientes dessa isoforma terão como finalidade principal garantir que seja feita a defesa da mucosa em um estômago com alguma alteração, ou seja, modular a resposta inflamatória fazendo com que ocorra a cicatrização de lesões gástricas ou infecção pré-existentes (Shafiq et al.⁵¹ 2005).

Portanto, pode-se afirmar que as mesmas participarão do processo de manutenção da integridade da mucosa gástrica por meio da secreção de fluídos e cloretos pela mucosa, impedindo com que haja invasão de bactérias na circulação sistêmica, além da redução da secreção de ácido, aumento da secreção de bicarbonato e melhora no fluxo sanguíneo (Takeeda et al.⁴ 2004, Yokota et al.⁵² 2007). Também fazem com que haja liberação de fatores de crescimento na área de úlcera contribuindo assim para reparação da mucosa e angiogênese (Konturek et al.⁴⁹ 2005).

Dessa forma, é possível concluir que ambas as isoformas são de extrema importância na manutenção da homeostasia do estômago tanto em condições fisiológicas normais como patológicas (Figura 3) (Takeeda et al.⁴ 2004).

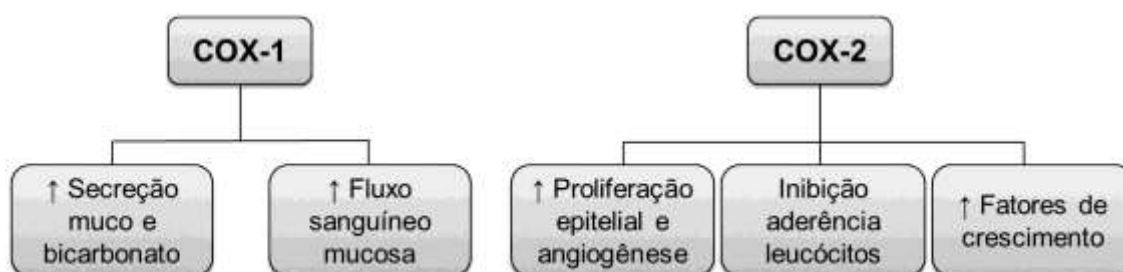


Figura 3. Funções das isoformas COX-1 e COX-2 no sistema gástrico (Konturek et al.⁴⁹ 2005, adaptado)

2.2.2 Sistema Renal

A COX-1, por ser uma isoenzima caracterizada como constitutiva, é responsável por manter as funções fisiológicas dos rins, podendo ser encontrada nos glomérulos (cápsula de Bowman), na região medular e cortical dos ductos coletores e nas arteríolas aferentes e eferentes (Kummer e Coelho¹⁸ 2002, Nantel et al.⁵³ 1999, DeMaria e Weir⁵⁴ 2003).

Os prostanóides provenientes dessa isoforma promovem a dilatação da vasculatura, diminuem a resistência vascular renal e aumentam a perfusão do órgão, assegurando assim um fluxo sanguíneo adequado do córtex renal para os néfrons na região intramedular (Batlouni⁵ 2010). Mais especificamente, a PGE₂ antagoniza a ação vasoconstritora da angiotensina II, e a PGD₂ causa depressão da liberação de norepinefrina. Além disso, a PGE₂ juntamente com PGF_{α2} possuem efeito diurético e natriurético e, assim como a PGI₂, antagonizam a ação da vasopressina (Batlouni⁵ 2010).

Adicionalmente, a COX-1 também é responsável por regular a hemodinâmica renal e a filtração glomerular (Moore et al.⁵⁵ 2015).

A enzima COX-2, embora considerada inicialmente patológica, também é encontrada de forma constitutiva nos rins, estando concentrada principalmente na porção medular e, em menor quantidade na cortical (Ahmetaj-Shala et al.⁵⁶ 2015). Está predominantemente presente nas células do músculo liso das arteríolas aferentes e eferentes, no endotélio (vasos retos e capilares medulares) e artéria renal, nos fibroblastos intersticiais e em podócitos de rins saudáveis (Khan et al.⁵⁷ 2014). É também expressa no ramo ascendente espesso da alça de Henle, além de ser comprovada sua existência na mácula densa, a qual é responsável por mediar a interação entre a filtração glomerular e reabsorção proximal e também controlar os níveis de íons sódio e potássio na luz do túbulo distal por meio do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Nantel et al.⁵³ 1999, Dubois et al.⁵⁸ 1998, Hao et al.⁵⁹ 2014, Kaminska et al.⁶⁰ 2014).

A COX-2 é capaz de regular a pressão sanguínea por meio da modulação fisiológica do tônus vascular e equilíbrio hídrico dos rins (Wang et al.⁶ 2014, Dubois et al.⁵⁸ 1998, Gonzalez et al.⁶¹ 2014). A PGE₂, sintetizada pelo epitélio tubular e células intersticiais, é expressa nos túbulos renais e regula o transporte de cloro e sódio na alça de Henle, além de auxiliar no transporte de água e no fluxo sanguíneo. A PGI₂, que está localizada no córtex renal, controla a taxa de filtração glomerular e a secreção de renina (DeMaria e Weir⁵⁴ 2003, Hao et al.⁵⁹ 2014).

Então, diante de um quadro de hipovolemia e redução nos níveis de sódio ocorre um aumento de COX-2 na região cortical e diminuição da sua expressão na região medular o que faz com que o sistema renina-angiotensina-aldosterona seja ativado. As células justaglomerulares da parede das arteríolas aferentes secretam o hormônio renina que irá contribuir para a formação de angiotensina II, a qual é responsável pela vasoconstrição da arteríola eferente juntamente com a norepinefrina e vasopressina, garantindo que seja aumentada a pressão hidrostática intraglomerular. Também estimula a liberação de aldosterona, a qual é um mineralocorticoide adrenal responsável por promover a reabsorção de sódio; e, por fim, induz a liberação de ADH, que aumenta a reabsorção de água e ureia. Ao mesmo tempo, a angiotensina provoca síntese de prostaglandinas renais vasodilatadoras (arteríola aferente) que garantem o feedback tubuloglomerular reestabelendo a taxa de filtração glomerular, e assegurando um fluxo sanguíneo normal, de forma a proteger o rim da deterioração funcional aguda (Figura 4) (Batlouni⁵ 2010, Kummer e Coelho¹⁸ 2002, Lipsky⁴⁴ 2000, Dubois et al.⁵⁸ 1998, Curiel e Katz⁶² 2013, Lomas e Grauer⁶³ 2015).

O feedback tubuloglomerular ocorre em consequência da concentração de NaCl, identificada na região de mácula densa nas células tubulares distais e justaglomerulares localizadas predominantemente na parede das arteríolas aferentes. Dessa forma, quando ocorre uma diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), a concentração de NaCl também é reduzida sendo necessária a vasodilatação da arteríola aferente para que a taxa de filtração

seja reestabelecida. Por outro lado, quando a TFG está alta, a concentração de NaCl também está, sendo necessária a vasoconstrição da arteríola aferente para retornar aos níveis normais (Lomas e Grauer⁶³ 2015).

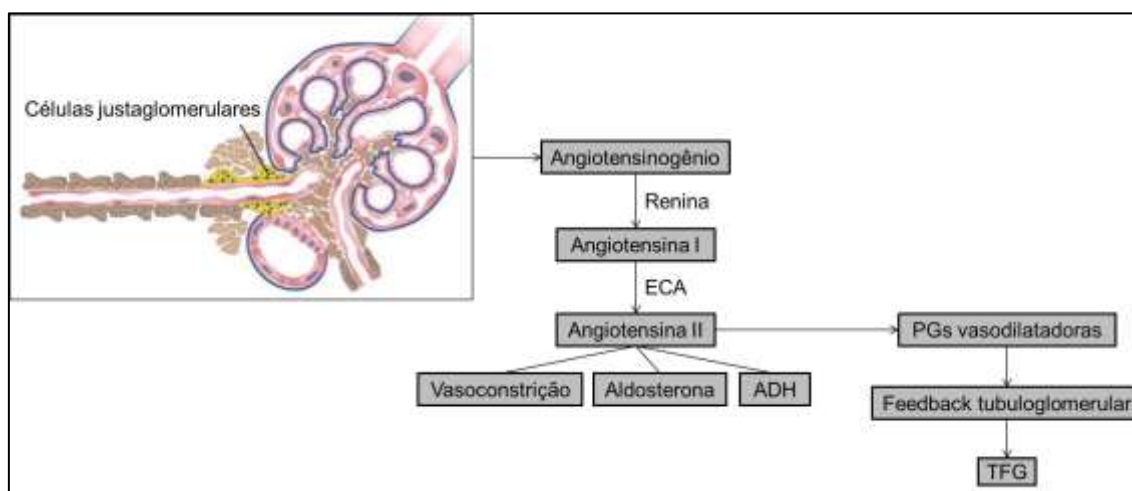


Figura 4. Esquema representativo da ativação e funcionamento do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Gomez e Sequeira Lopez⁶⁴ 2009, adaptado)

Sendo assim, no rim, ambas as isoformas da COX irão desempenhar importantes papéis, cada uma com suas funções e localizações específicas (Hao et al.⁵⁹ 2014, Kaminska et al.⁶⁰ 2014).

2.3 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS – INTERAÇÕES

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) representam o grupo farmacológico mais prescrito em todo o mundo, chegando a serem usados diariamente por mais de 30 milhões de pacientes (Hunt e Bazzoli⁶⁵ 2004, Gargallo et al.⁶⁶ 2014). Seu alto consumo é consequência de sua eficácia, baixo potencial de abuso e longa história de uso clínico (Brune e Patrignani⁶⁷ 2015).

É sabido que a dor representa o maior problema público de saúde no mundo e, uma dor aguda não tratada pode vir a trazer consequências deletérias para a saúde e acabar se transformando em dor crônica, a qual afeta

aproximadamente 27% da população europeia e mais de 100 milhões nos EUA. Sendo assim, os AINEs são os responsáveis por controlar a dor, febre e inflamação (Moore et al.⁵⁵ 2015, Brune e Patrignani⁶⁷ 2015, Dallob et al.⁶⁸ 2003). Mais especificamente, podem ser usados para o alívio de dor crônica musculoesquelética ou doenças inflamatórias como artrite reumatóide e osteoartrite. Também podem ser usados para dores agudas, como dor de cabeça, de dente, nas costas, cólicas menstruais e dores musculares, além de resfriado comum (Moore et al.⁵⁵ 2015).

O primeiro medicamento desse grupo foi descoberto há mais de 100 anos (ácido acetilsalicílico), porém, apenas tempos depois, com o uso de modelos animais que induziam dor e inflamação, foram descobertos novos medicamentos como ibuprofeno e diclofenaco (Brune e Patrignani⁶⁷ 2015). Na década de 1940, ocorreu a introdução de fenilbutazona, aparecendo os fenamatos em 1950, e a indometacina em 1960. Mais tarde, apareceram os propionatos (1970) e os oxicams (1980) (Flower⁴³ 2003).

O mecanismo de ação dos AINEs baseia-se na inibição competitiva da enzima ciclooxigenase (COX), a qual estará relacionada com a formação de prostanoídes. Dessa forma, seu perfil de segurança está relacionado com as suas ações em COX-1 e COX-2 (Amer et al.⁷ 2010).

Sabe-se que todos os AINEs inibem a isoforma COX-2 e acabam por inibir a COX-1 em diferentes graus equivalendo a um efeito secundário. Assim, esses fármacos podem ser classificados em não seletivos que inibem ambas as isoformas da COX (ex. Ibuprofeno), e os “coxibes”, grupo de inibidores altamente seletivos da COX-2 (ex. Etoricoxibe) (Dubois et al.³ 2004, Cairns³⁵ 2007).

Os AINEs não seletivos podem vir a provocar injúrias, úlceras, perfurações e sangramentos na mucosa gástrica pelo fato de atuarem de maneira expressiva sobre a isoforma COX-1, a qual é responsável por manter a homeostasia de vários órgãos e sistemas no organismo (Kwiecien et al.² 2015). Neste sentido, pacientes que fazem uso de AINEs apresentam maior

risco (3 a 5 vezes) de desenvolver úlcera gástrica e hemorragia em comparação aos não-usuários (Filaretova et al.⁵⁰ 2011).

Para evitar esses efeitos deletérios ao organismo, nas décadas de 1990 e 2000, surgiram os inibidores seletivos da COX-2 (Flower⁴³ 2003, Brune e Patrignani⁶⁷ 2015). Inicialmente, acreditava-se que eles tinham o mesmo efeito anti-inflamatório e analgésico, porém, não provocavam injúria gástrica. No entanto, por bloquearem prostaciclina (PGI₂) provenientes da COX-2, responsáveis pela vasodilatação e inibição da agregação plaquetária, contrapondo o tromboxano proveniente da COX-1, seu uso pode provocar sérios problemas cardiovasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Dallob et al.⁶⁸ 2003, Nagi et al.⁶⁹ 2015).

Em 2004 e 2005, devido ao aumento do risco de eventos trombóticos aos pacientes, rofecoxibe e valdecoxibe, famosos inibidores da COX-2, foram retirados do mercado, respectivamente. Hoje, após muitas pesquisas, sabe-se que tanto os AINEs não seletivos, quanto os coxibes podem aumentar o risco cardiovascular, porém, esse irá variar de acordo com o medicamento (seletividade) e dose usados (Gargallo et al.⁶⁶ 2014, Brune e Patrignani⁶⁷ 2015, Bhala et al.⁷⁰ 2013, McGettigan e Henry⁷¹ 2006, Grosser et al.⁷² 2006, Patrignani et al.⁷³ 2011).

Apesar de sua grande eficácia clínica, em virtude de seu mecanismo de ação, o uso de diferentes AINEs, seletivos ou não, pode estar associado a importantes efeitos colaterais, tais como lesões gástricas e renais. Além disso, a associação dos mesmos pode vir a potencializar os efeitos deletérios provocados ao organismo (Amer et al.⁷ 2010).

Em estudo clínico desenvolvido por Laine e colaboradores, o uso crônico de AINEs seletivos ou não seletivos para COX-2 foi capaz de desencadear injúria gástrica significativa (Laine et al.⁷⁴ 2003). Além disso, em estudo realizado por Wallace e colaboradores, o uso isolado, em dose única, de um AINE não seletivo e de um coxibe provocou dano gástrico leve em ratos, porém, ao fazer a administração concomitante dos mesmos, acabaram provocando lesões hemorrágicas (Wallace et al.¹¹ 2000). Esse mesmo

resultado foi encontrado em estudo anterior, onde se afirma que os efeitos gástricos não são desencadeados apenas pela inibição da COX-1, mas requerem também a inibição de COX-2 (Zinkievich et al.⁸ 2010).

Em relação ao sistema renal, por meio de estudos realizados em modelos animais, autores relataram que tanto o uso, por um período prolongado, de AINEs não seletivos como o de coxibes pode ser responsável pelo desenvolvimento fibrose renal, necrose e dilatação tubular, além de retenção de sódio e água provocando aumento da pressão sanguínea (Inal et al.⁹ 2014, Cairns³⁵ 2007, Kockaya et al.⁷⁵ 2010). Ahmetaj-Shala e colaboradores, observaram, em estudo clínico, que o uso de um AINE não seletivo ou de um coxibe por um período de 7 dias foi responsável por promover um aumento na creatinina sérica como consequência do bloqueio da isoforma COX-2 (Ahmetaj-Shala et al.⁵⁶ 2015). Em acréscimo, em uma meta-análise realizada recentemente, foi constatado que pacientes que fazem uso de AINEs apresentam maior risco de desenvolver alguma alteração renal (Ungprasert et al.¹⁰ 2015).

Dessa forma, a escolha de um fármaco deve ser feita baseada no perfil do paciente e a mesma deve ser usada na menor dose efetiva possível e pelo menor período de tempo para que os riscos adversos sejam reduzidos (Brune e Patrignani⁶⁷ 2015).

2.4 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

O ácido acetilsalicílico provém da *Salix alba* (salgueiro). A salicina obtida pela planta sofre hidrólise e, conseqüentemente, é oxidada formando o ácido salicílico. Esse ácido pode sofrer ação do éster de carbonila sendo formado o salicilato de metila, ou do éster de hidroxila, dando origem ao ácido acetilsalicílico. Sua primeira síntese ocorreu em 1853, porém sua introdução no comércio deu-se apenas em 1897 (Figura 5) (Steinhubi⁷⁶ 2011).

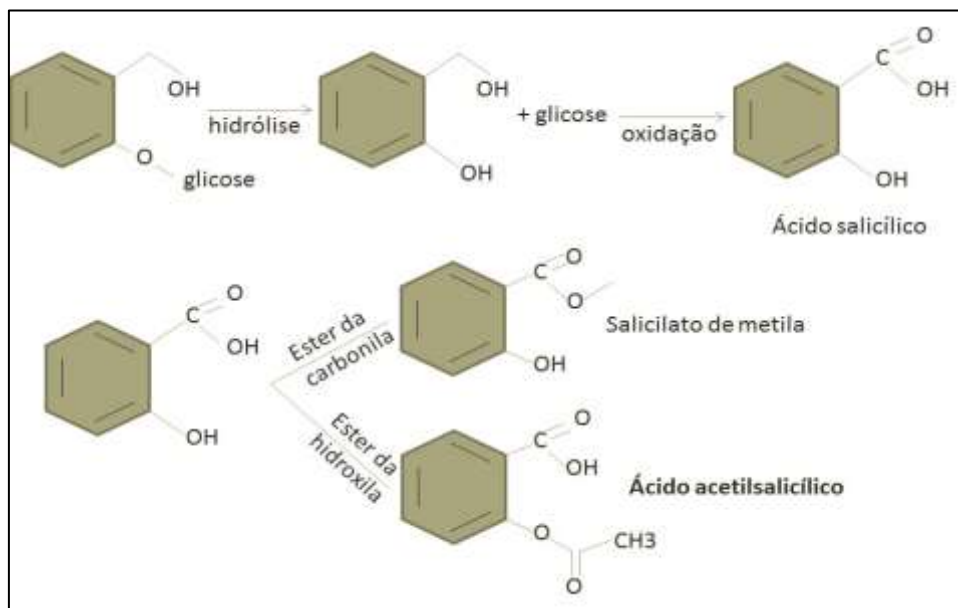


Figura 5. Acetilação do ácido salicílico para ácido acetilsalicílico (o autor)

O ácido acetilsalicílico, usado inicialmente para combater a dor e controlar a febre, teve sua atividade anti-inflamatória identificada apenas nos séculos seguintes. Com o seu uso, começou-se a observar sua relação com quadros de sangramento anormal, sendo considerado um anti-plaquetário em 1966. Porém, apenas em 1971, o pesquisador John Vane estabeleceu seu verdadeiro mecanismo de ação, o qual ocorre por meio da inibição da COX (Steinhubl⁷⁶ 2011).

Assim, é considerado hoje um anti-inflamatório não-esteroidal com efeito anti-inflamatório, analgésico, antipirético e anti-agregante plaquetário de baixo custo e com ampla disponibilidade no mercado (Akyazi et al.²³ 2013, Barudzic et al.³⁶ 2013, Akagi et al.⁷⁷ 2011, Roth et al.⁷⁸ 2014). Estes efeitos são definidos de acordo com a dose e tempo utilizados. A modulação da resposta inflamatória e o alívio da dor ocorrem com altas doses (500 mg a cada 4 a 8 horas) por um curto período de tempo (3 dias). Já seu efeito anti-agregante é obtido com o uso de baixas doses (75 a 325 mg por dia) por um período mais prolongado (Cryer e Mahaffey⁴⁸ 2014, Akinwusi et al.⁷⁹ 2013).

O uso do ácido acetilsalicílico em baixa dose é recomendado como medida de prevenção primária em pacientes com alto risco de desenvolver

doença cardiovascular (DCV), nos casos onde o benefício do uso supera o risco. Além disso, há forte evidência de que o mesmo é benéfico para a prevenção secundária de eventos cardiovasculares, ou seja, prevenção dos sinais ou sintomas evidentes após o processo de doença já ter iniciado (Wang et al.⁶ 2014, Akagi et al.⁷⁷ 2011, Hissett et al.⁸⁰ 2014). Dessa forma, seu uso é amplamente empregado no tratamento de síndromes coronárias agudas, profilaxia de pacientes submetidos à angioplastia percutânea ou enxerto vascular, e na prevenção em longo prazo de eventos cardiovasculares (Wang et al.⁶ 2014, Lin et al.⁸¹ 2013).

Quanto à sua farmacocinética, parte do ácido acetilsalicílico chega a atingir a circulação sistêmica sob a forma de ácido salicílico em virtude da hidrólise pelas esterases da mucosa gastrointestinal e do fígado, já o restante é absorvido por solução ácida no estômago, embora seu principal local de absorção seja no intestino delgado por meio da difusão passiva de sua forma não-ionizada (Murtaza et al.³⁷ 2014). Sua metabolização é hepática, dando origem a vários metabólitos inativos (Murtaza et al.³⁷ 2014).

É degradado em ácido acético + ácido salicílico e seu tempo de meia-vida no plasma é cerca de 15 minutos, valor esse que aumenta conforme o aumento da dose de salicilato. Dessa forma, sua eliminação, essencialmente renal, depende da dose, uma vez que o metabolismo é limitado pela capacidade das enzimas. A excreção total do ácido salicílico não aumenta proporcionalmente com a dose, mas a excreção de ácido salicílico não metabolizado é aumentada com doses mais elevadas. Sendo assim, sua excreção é variável e depende da dose e do pH urinário (Patrignani et al.⁸² 2014).

Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da atividade da ciclooxigenase (COX) (Cairns³⁵ 2007). O ácido acetilsalicílico liga-se de forma covalente e irreversível às enzimas COX-1 e COX-2, inibindo as mesmas por acetilação da serina 530 e serina 516 em seus respectivos sítios ativos. Entretanto, possui uma inibição 170 vezes mais potente sobre COX-1, em comparação com a COX-2. Dessa forma, afeta principalmente a via de TXA₂

que é a principal via de ativação de plaquetas, induzindo defeitos funcionais duradouros das mesmas (Wang et al.⁶ 2014, Kovacs et al.³⁸ 2014, Vaucher et al.⁸³ 2014). Como essas células não apresentam núcleo, ficam impedidas de sintetizar novamente a COX-1, sendo mantida a cessação da síntese de TXA₂ durante toda a vida da plaqueta, que varia de 7 a 10 dias (efeito anti-trombótico) (Figura 6) (Cairns³⁵ 2007, Murtaza et al.³⁷ 2014, Akagi et al.⁷⁷ 2011).

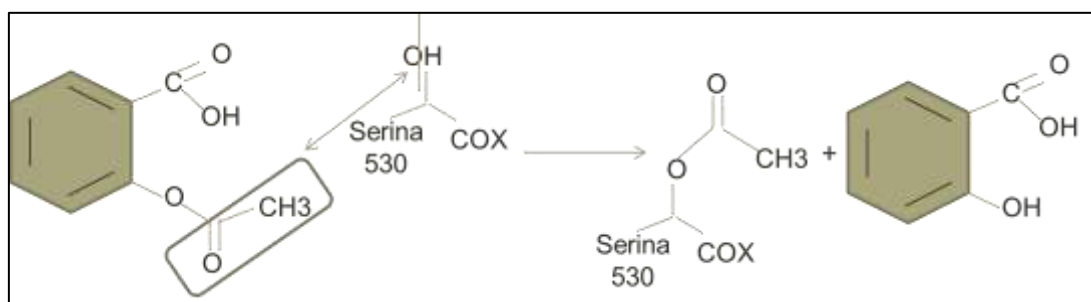


Figura 6. Acetilação da COX-1 na posição serina 530 (o autor)

Desta forma, pode-se afirmar que a função protetora cardiovascular do ácido acetilsalicílico baseia-se na sua capacidade de inibir a agregação de plaquetas, evitando consequentemente a formação de tampão plaquetário nos vasos ateroscleróticos (Marcucci et al.⁸⁴ 2014).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar lesão gástrica e lesão e função renal consequentes da interação de anti-inflamatório seletivo e não seletivo para COX-2 com o uso prolongado de baixa dose de ácido acetilsalicílico em ratos.

3.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

- Avaliação da morfologia (presença de alterações macroscópicas) gástrica;
- Avaliação da morfologia (presença de alterações macroscópicas) renal;
- Avaliação da função renal (quantificação de creatinina).

4 MATERIAIS E MÉTODO

Esta pesquisa segue as instruções da Arrive Guidelines de estudos envolvendo animais (Kilkenny et al.⁸⁵ 2011) e foi aprovada por meio do parecer nº 040/2014 pela Comissão de Ética do uso animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa – CEUA – UEPG, (protocolo UEPG nº 16856/2014 – proceso CEUA nº 040/2014) (Anexo A).

4.1 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO (CÁLCULO AMOSTRAL)

A determinação do número de animais foi baseada na análise (média/desvio padrão) de dados do projeto piloto realizado. Neste sentido, assumindo um tamanho de efeito alto (d de Cohen) de 1.5, com um poder estatístico de 80% e um nível de significância de 5% (Software GPower 3.1), obtivemos um “n” amostral mínimo de 8 animais/grupo.

4.2 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, machos), provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa/ Paraná – Brasil), com idade de aproximadamente 10 semanas e peso entre 250 e 280 g. A manipulação dos animais seguiu as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e a lei 11794, de 8 de outubro de 2008.

4.3 FÁRMACOS UTILIZADOS NO ESTUDO

Ácido acetilsalicílico >99% cristalino (Sigma-Aldrich – São Paulo, SP, Brasil); Ibuprofeno (Fagron – São Paulo, SP, Brasil); Etoricoxibe (Frosst Ibérica S.A. – Madrid, Espanha). Todos os medicamentos foram diluídos em água

destilada com carboximetilcelulose de sódio (0,5%) (Galena Química e Farmacêutica Ltda. – Campinas, SP, Brasil).

4.4 DIVISÃO DOS GRUPOS, ADMINISTRAÇÃO DOS TRATAMENTOS E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os 48 animais foram randomizados e divididos em seis grupos experimentais com 8 animais/ cada, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Divisão dos grupos de pesquisa de acordo com as soluções e terapias utilizadas

	BDA	AINE	Dose	Referências
CMC	-	-	-	-
BDA	+	-	6,75 mg/kg/dia	(Akyazi et al. ²³ 2013, Ghosh et al. ⁸⁶ 2011)
BDA+Ibu	+	Ibuprofeno	6,75 mg/kg/dia+40 mg/kg/dia	(Liu et al. ⁸⁷ 2014, Ozturk Bilgin et al. ⁸⁸ 2013)
Ibu	-	Ibuprofeno	40 mg/kg/dia	
BDA+Eto	+	Etoricoxibe	6,75 mg/kg/dia+10 mg/kg/dia	(Baracho et al. ⁸⁹ 2009, Bressan e Tonussi ⁹⁰ 2008, Dhull et al. ⁹¹ 2012, Fornai et al. ⁹² 2014, Fracon et al. ⁹³ 2010, Maheshwari et al. ⁹⁴ 2011, Mendes et al. ⁹⁵ 2014)
Eto	-	Etoricoxibe	10mg/kg/dia	

Durante o período experimental os animais ficaram mantidos em caixas (4 ratos/ cada) forradas com maravalha no biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, e receberam ração balanceada e água *ad libitum*. A temperatura da sala foi mantida a 22°C, sob ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas.

Para simular o uso prolongado de baixa dose de ácido acetilsalicílico, esse foi usado durante 45 dias de acordo com a metodologia (Basselin et al.⁹⁶ 2011, Renna et al.⁹⁷ 2009, Smith et al.⁹⁸ 2002), por meio da administração intragástrica pelo método de gavagem, sendo feita sua diluição em solução de carboximetilcelulose de sódio 0,5% (CMC). A dose administrada foi de 6,75 mg/kg, a qual corresponde a 75 mg em humanos (Akyazi et al.²³ 2013, Ghosh et al.⁸⁶ 2011).

A partir do 43º dia, foi iniciado o uso de AINE, o qual foi mantido por 3 dias. Após o terceiro dia, os animais foram sacrificados para realização das avaliações. Dessa forma, foi possível simular o uso dos AINEs para o controle

da inflamação aguda. A administração de ácido acetilsalicílico foi mantida durante o uso de AINE, garantindo a avaliação da associação farmacológica (Figura 7).

Com o objetivo de avaliar o efeito isolado dos AINEs, um grupo recebeu administração de Ibufreno, e outro, Etoricoxibe sem o uso concomitante de qualquer outro fármaco durante três dias. O grupo CMC recebeu apenas 1 mL de solução aquosa de carboximetilcelulose de sódio 0,5% durante os 45 dias, enquanto o grupo BDA recebeu apenas solução de ácido acetilsalicílico pelo mesmo período de tempo.

A administração intragástrica pelo método da gavagem foi realizada todos os dias no período da manhã e, nos grupos que receberam administração de BDA com um AINE específico, o intervalo de tempo de administração foi de duas horas, iniciando com a BDA e depois o uso de AINE a fim de evitar uma possível inibição competitiva enzimática provocada por este, assegurando o efeito antiplaquetário do ácido acetilsalicílico (Akagi et al.⁷⁷ 2011).

Para realização da coleta de sangue, os animais receberam, via injeção intraperitoneal (IP), uma solução contendo anestésico quetamina 10% (90 mg/kg) e relaxante muscular xilasina 2% (10 mg/kg). Por fim, para realização do sacrifício, este foi feito por meio do método da sobredosagem anestésica utilizando o dobro da dose inicial segundo as recomendações do *Canadian Council on Animal Care* (CCAC).

Todos os parâmetros foram testados previamente por meio de um projeto piloto.

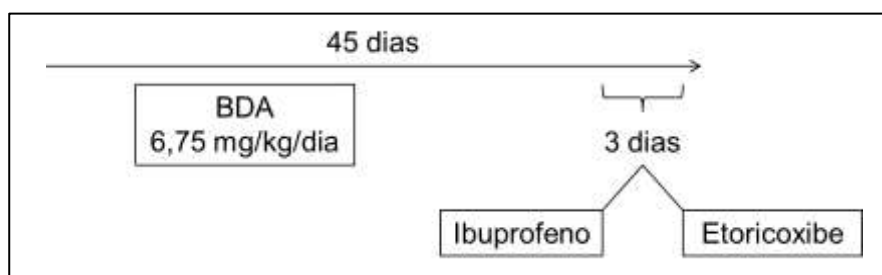


Figura 7. Representação do estudo (o autor)

4.5 AVALIAÇÃO DOS DANOS GÁSTRICOS

4.5.1 Avaliação macroscópica

Após o sacrifício, os estômagos foram isolados, cortados ao longo eixo da sua curvatura maior objetivando expor a mucosa gástrica, a qual foi lavada com solução salina a 0,9%. Para registrar e investigar o grau de lesão da mucosa, as peças foram fotografadas com uma câmera digital (Nikon D5300). A avaliação macroscópica foi feita com o auxílio do programa digital Image J. A área de lesão encontrada (em mm²) foi expressa como uma porcentagem da área total do estômago (em mm²), seguindo a metodologia utilizada por Shin et al (2013) e Andrade et al (2006) (Figura 8) (Shin et al.⁹⁹ 2013, Andrade et al.¹⁰⁰ 2006, Ribeiro et al.¹⁰¹ 2013).

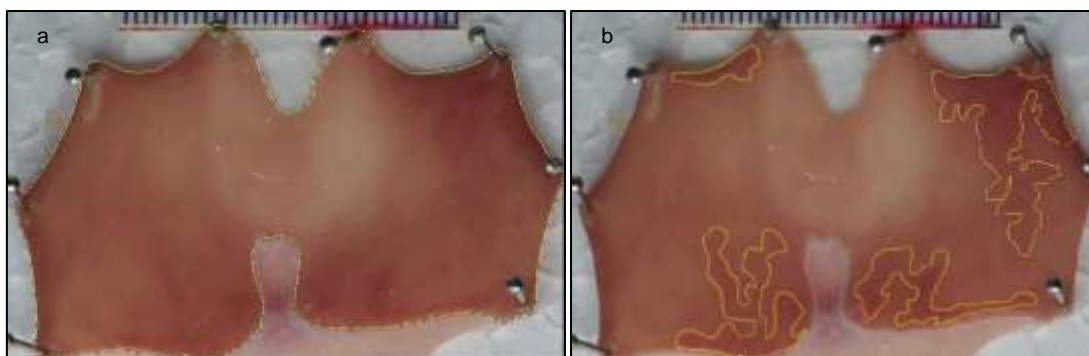


Figura 8. a) Mensuração da área total do estômago, em mm² e; b) Mensuração da área da lesão encontrada, em mm²

4.6 AVALIAÇÃO DOS DANOS E FUNÇÃO RENAL

4.6.1 Avaliação macroscópica

Após os ratos serem sacrificados, os rins foram removidos e seccionados longitudinalmente em dois fragmentos. Para registro e futura avaliação macroscópica, as peças foram fotografadas com uma câmera digital (Nikon D5300). A análise foi feita na porção cortical e medular, de forma a

identificar a presença ou ausência de edema, focos hemorrágicos e necrose tubular (Figura 9) (Rodrigues et al.¹⁰² 2012).

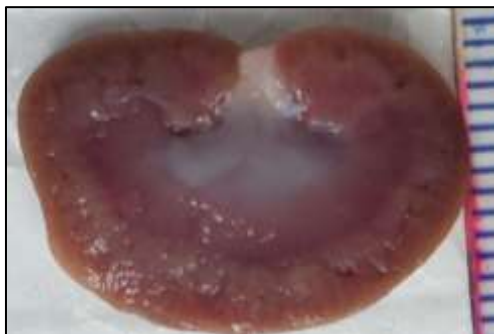


Figura 9. Anatomia renal (região medular e cortical) - Avaliação da presença ou ausência de edema, focos hemorrágicos e necrose tubular

4.6.2 Avaliação da função renal

Para determinação da quantidade de creatinina presente no soro (Cr), a coleta de sangue (3mL) foi feita por meio da artéria aorta com os ratos previamente anestesiados, imediatamente antes do sacrifício dos mesmos. As amostras de sangue foram centrifugadas a 735 x g durante 10 minutos, sendo adicionados ao soro obtido dois reagentes de kit específico (Creatinina WS – Kovalent). A concentração de Cr foi avaliada com o auxílio de um analisador bioquímico (Respons 920 – ByoSys) utilizando comprimento de onda específico com faixa de absorção entre 485-520 nm (método colorimétrico) (Khan et al.⁵⁷ 2014, Ivanov et al.¹⁰³ 2014, Berger et al.¹⁰⁴ 2014).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os cálculos estatísticos foram feitos utilizando um software específico (GraphPad Prism 6), sendo os resultados apresentados como média \pm erro padrão de cada grupo experimental. Para análise estatística foi utilizado o teste paramétrico ANOVA seguido pelo pós teste Tukey para múltipla

comparação entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Como descrito anteriormente, os animais foram divididos em 6 grupos com 8 ratos em cada. A descrição dos tratamentos se encontra na Tabela 1 na sessão de materiais e método.

5.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA GÁSTRICA

O efeito provocado na mucosa gástrica pela administração de CMC, dos diferentes AINEs e da baixa dose de ácido acetilsalicílico (BDA) isoladamente, assim como a interação da BDA com os AINEs encontra-se na Figura 10.

Porcentagem de Lesão Gástrica Macroscópica

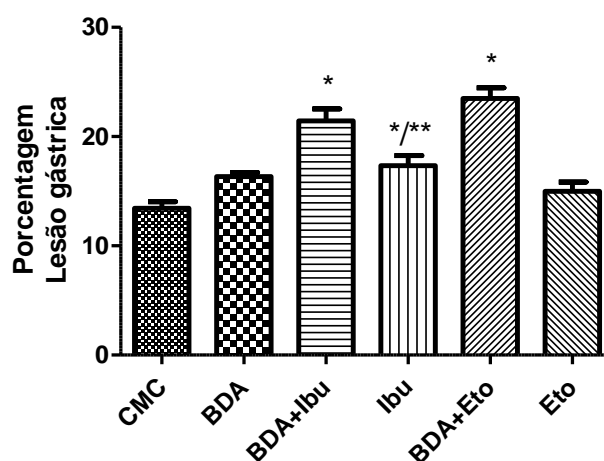


Figura 10. Porcentagem de lesão gástrica encontrada nos diferentes grupos
*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CMC ($p < 0,05$); **Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos BDA+Ibu e BDA+Eto ($p < 0,05$)

Ao observar os resultados encontrados, pode-se afirmar que no grupo em que foi feita administração isolada de Etoricoxibe - Eto não foi encontrada lesão estatisticamente significativa em relação ao grupo CMC. E, embora o grupo que recebeu apenas Ibuprofeno - Ibu tenha apresentado lesão significativa, os grupos com maior quantidade de lesão gástrica foram os que interagiram BDA com Ibuprofeno - BDA+Ibu (AINE não seletivo) e com Etoricoxibe - BDA+Eto (seletivo COX-2), não apresentando diferença

estatisticamente significativa entre si, porém diferentes estatisticamente dos demais grupos.

A Figura 11 representa imagens ilustrativas da mucosa gástrica dos diferentes grupos.

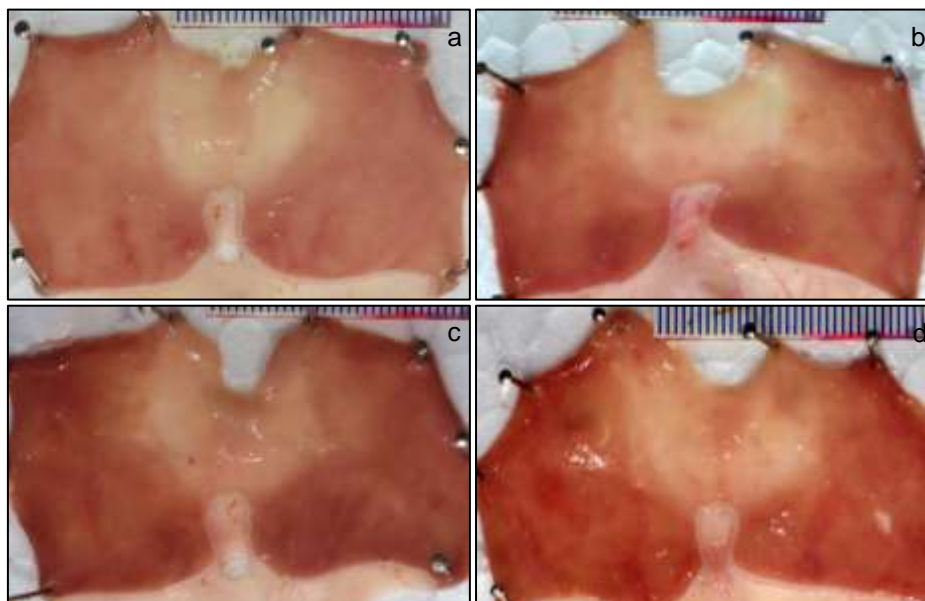


Figura 11. Análise macroscópica gástrica. a) Grupo CMC: áreas menos avermelhadas e menor processo inflamatório; b) Grupo Ibu: aumento região avermelhada indicando maior processo inflamatório; c) Grupo BDA+Ibu e d) Grupo BDA+Eto: maior quantidade de áreas avermelhadas com intensificação do processo inflamatório.

5.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA RENAL

Em relação à análise macroscópica renal, não se observou lesões nos grupos avaliados.

A Figura 12 representa o padrão renal observado, onde nenhum grupo apresentou processo inflamatório significativo.



Figura 12. Manutenção da estrutura renal

5.3 DETERMINAÇÃO CREATININA SÉRICA

Os valores encontrados ao ser realizada a quantificação de creatinina no soro estão na Figura 13. Pode-se afirmar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

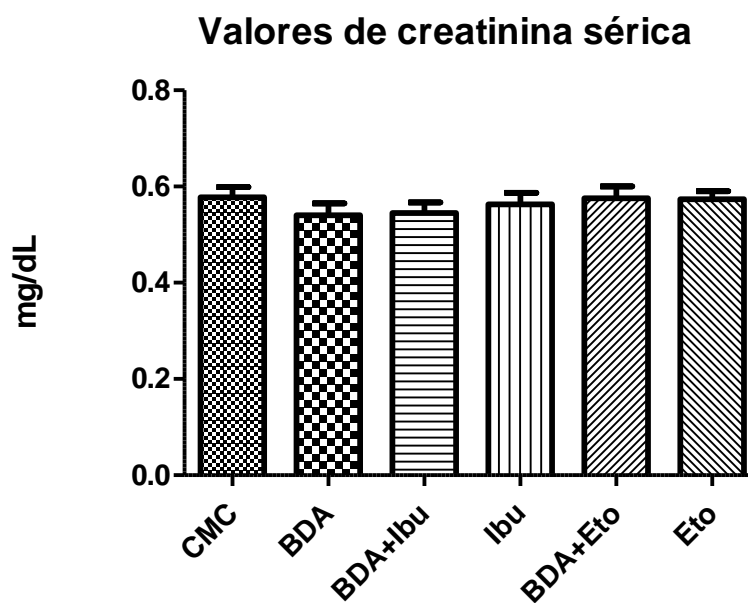


Figura 13. Valores em mg/dL de creatinina no soro sanguíneo

6 DISCUSSÃO

Inicialmente, o presente estudo avaliou o efeito do uso prolongado da BDA sobre a mucosa gástrica. Como resultado, embora se tenha observado um maior índice de lesões gástricas no grupo de animais que receberam BDA quando comparado ao grupo CMC, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Considerando que estudos demonstram que mesmo o uso isolado de BDA já representa um fator de risco para o desenvolvimento de lesões gástricas em decorrência da inibição da COX-1, impedindo assim que a mesma mantenha sua função citoprotetora (Iwamoto et al.¹⁰⁵ 2013, Nishino et al.¹⁰⁶ 2013, Soares¹⁰⁷ 2009, Venerito et al.¹⁰⁸ 2006), a não observação de significância pode estar associada à dose utilizada de 6,75 mg/kg/dia a qual equivale a 75 mg/dia em humanos, menor dose clínica comumente utilizada para a finalidade cardioprotetora (Akyazi et al.²³ 2013, Ghosh et al.⁸⁶ 2011).

Laine e colaboradores, em estudo clínico, observaram que pacientes que fizeram uso de 81 mg de ácido acetilsalicílico, por um período prolongado, não apresentaram um aumento significativo de formação de úlcera após 12 semanas em comparação ao placebo, podendo dessa forma justificar os resultados encontrados em decorrência da dose clínica ter equivalência próxima a dose usada no modelo animal (Laine et al.¹⁰⁹ 2004). De forma complementar, trabalhos demonstram que à medida que a dose aumenta, o risco de alteração gástrica também aumenta. Neste sentido, Weil e colaboradores, ao comparar doses de 75 e 300 mg/dia, relatam que a probabilidade de ocorrência de injúria é aproximadamente o dobro nos usuários de doses maiores (2,3 e 3,9, respectivamente para 75 e 300 mg/dia) (Weil et al.¹¹⁰ 1995). Yeomans e colaboradores também relatam que usuários de doses entre 101 e 325 mg/dia após 8 e 26 semanas apresentam maior incidência de úlcera em comparação aos que usam de 75 a 100 mg/dia (Yeomans et al.¹¹¹ 2009).

Conforme mencionado, em decorrência da importância de um melhor entendimento sobre os efeitos colaterais da interação entre BDA e AINEs

comumente empregados na prática clínica, o presente estudo foi conduzido com AINEs seletivos e não seletivos para COX-2: 1) Ibuprofeno, inibidor de COX-1 e COX-2 (IC_{50} (ug/mL) = 15 para COX-1/COX-2) e 2) Etoricoxibe, seletivo para COX-2 (IC_{50} (ug/mL) = 0,0029 para COX-1/COX-2) (Mitchell et al.¹¹² 1993, Patrignani et al.¹¹³ 2003). Neste sentido, enquanto o uso isolado de Etoricoxibe não induziu a maiores porcentagens de lesões gástricas em relação ao grupo CMC, os grupos Ibuprofeno, BDA + Ibuprofeno e BDA + Etoricoxibe foram capazes de aumentar significativamente a porcentagem de lesão neste órgão (Figura 14).

A não observação de lesão gástrica com o uso isolado do Etoricoxibe pode ser decorrente de uma inibição seletiva sobre COX-2. Neste sentido, com a preservação da função de COX-1, a proteção gástrica é mantida, uma vez que esta é responsável pela produção de muco, inibição da secreção de ácido, manutenção de um fluxo sanguíneo adequado, dentre outras. Porém, este mecanismo protetor é perdido quando há uma inibição prévia de COX-1. Este efeito foi detectado no presente estudo, uma vez que a combinação entre BDA e Etoricoxibe levou a maiores porcentagens de lesões gástricas. De forma similar, diferentes estudos clínicos também relatam uma possível perda do “efeito protetor” de um inibidor seletivo de COX-2, quando da inibição de COX-1, como, por exemplo, pelo uso da BDA (Laine et al.¹⁰⁹ 2004, Lanas et al.¹¹⁴ 2006, Silverstein et al.¹¹⁵ 2000). Isto se deve ao fato da COX-2 estar associada com o processo de reparo e cicatrização (Kwiecien et al.² 2015). Kwiecien e colaboradores destacam que a inibição de COX-2 é relacionada com um atraso no processo de cicatrização normal da mucosa de pacientes submetidos previamente a terapia medicamentosa com inibição de COX-1, promovendo um maior risco para lesões gástricas (Kwiecien et al.² 2015).

Outro achado do estudo atual foi que, embora o uso de Ibuprofeno isolado tenha provocado uma porcentagem significativa de lesão gástrica comparada ao grupo CMC, a combinação deste fármaco com BDA resultou em maior desenvolvimento de lesões (maior que grupos Ibuprofeno, BDA, CMC). Este efeito pode ser decorrente de um efeito sinérgico de inibição de COX-1

(Lanas et al.¹¹⁶ 2000, Sorensen et al.¹¹⁷ 2000). Kawasaki e colaboradores, em estudo conduzido com 1.009 pacientes (341 casos e 668 controles), por um período de duas semanas, observaram um risco de sangramento gástrico de 1,35 para usuários de AINE isolado, e 3,59 quando da combinação do mesmo com BDA (Kawasaki et al.¹¹⁸ 2015). Lanas e colaboradores ainda observaram que, em estudo clínico, esse risco de hemorragia gástrica para usuários de BDA e AINEs foi de 3,9 e 5,3, respectivamente, porém, ao associar o uso de ambos, o mesmo aumentou para 12,7 (Lanas et al.¹¹⁴ 2006). Assim, concordando com os resultados encontrados, é possível afirmar que o uso concomitante de AINEs e BDA tende a aumentar consideravelmente a presença de lesão gástrica (Soares¹⁰⁷ 2009).

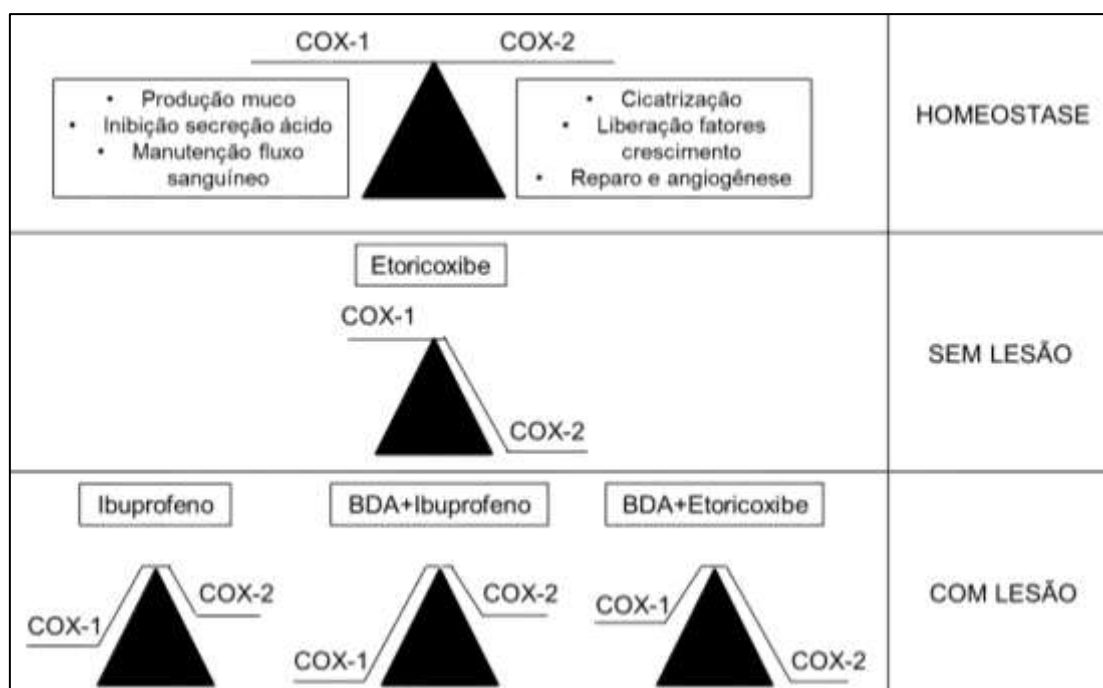


Figura 14. Representação esquemática dos resultados encontrados em consequência do bloqueio das diferentes isoformas da ciclooxigenase com o uso isolado de Ibuprofeno e Etoricoxibe ou em associação com a BDA (o autor)

Em acréscimo aos efeitos gástricos, o presente trabalho avaliou os efeitos destas terapias (isoladas e combinações) sobre o tecido e função renal. Como resultado obtido, nenhum dos grupos estudados apresentou lesão

significativa ou alteração funcional. Devido à inibição da enzima COX e consequentemente suas PGs, o uso de um AINE não seletivo ou coxibe pode vir a provocar alterações na taxa de filtração glomerular e regulação de sódio e água (Ahmetaj-Shala et al.⁵⁶ 2015, Snowden e Nelson¹¹⁹ 2011). Porém, diferentes autores afirmam que essas PGs usualmente, em situações fisiológicas, não são as principais responsáveis pela manutenção da homeostasia, tendo suas funções exercidas de maneira expressiva apenas em situações de doenças renais prévias, justificando assim os resultados encontrados (Ungprasert et al.¹⁰ 2015, Dreischulte et al.¹²⁰ 2015).

Além disso, ao utilizar AINEs por um curto período de tempo, as possíveis alterações hemodinâmicas provocadas no sistema renal são reversíveis. Por outro lado, quando o uso de um anti-inflamatório é prolongado e em alta dose, o risco de toxicidade aos rins é acentuado (Lomas e Grauer⁶³ 2015). Então, embora o uso da BDA tenha sido feito por um período prolongado, seus efeitos deletérios foram reduzidos em consequência de sua dose utilizada. Em contrapartida, ao usar Ibuprofeno e Etoricoxibe em doses clínicas convencionais, o risco de toxicidade renal também foi reduzido em razão dos mesmos serem administrados por um curto tempo (3 dias). De forma a concordar com os resultados obtidos, em ensaios clínicos randomizados, o uso de diferentes AINEs (seletivos ou não para COX-2) não foi capaz de provocar qualquer alteração renal estatisticamente significativa (Ungprasert et al.¹⁰ 2015, Zhang et al.¹²¹ 2006).

Pode-se afirmar desta forma que, embora os AINEs possam comprometer a função renal por meio da inibição de COX-1 e/ou COX-2, a probabilidade de ocorrência de qualquer alteração aumenta consideravelmente na presença de fatores de risco pré-existentes, como disfunção renal, idade avançada, diabetes, hipertensão; ou em decorrência da dose e tempo utilizados (Moore et al.⁵⁵ 2015).

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que as maiores porcentagens de lesão gástrica foram observadas quando do uso prolongado da BDA em associação com um AINE não seletivo (Ibuprofeno) e com um inibidor seletivo COX-2 (Etoricoxibe). Além disso, o uso isolado de Ibuprofeno também provocou lesão gástrica significativa, porém, em menor porcentagem. Por outro lado, nenhum grupo foi capaz de provocar alteração significativa sobre o tecido e função renal.

8 REFERÊNCIAS

1. Shiotani A, Sakakibara T, Nomura M, Yamanaka Y, Nishi R, Imamura H, et al. Aspirin-induced peptic ulcer and genetic polymorphisms. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010; May;25 Suppl 1:S31-4.
2. Kwiecien S, Magierowska K, Sliwowski Z, Wojcik D, Magierowski M, Brzozowski T. New insight into the mechanisms of gastroduodenal injury induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: practical implications. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2015;125(3):191-8.
3. Dubois RW, Melmed GY, Henning JM, Bernal M. Risk of Upper Gastrointestinal Injury and Events in Patients Treated With Cyclooxygenase (COX)-1/COX-2 Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs), COX-2 Selective NSAIDs, and Gastroprotective Cotherapy: An Appraisal of the Literature. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*. 2004; Aug;10(4):178-89.
4. Takeeda M, Hayashi Y, Yamato M, Murakami M, Takeuchi K. Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isoenzymes in mucosal defense of inflamed rat stomach. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2004; Mar;55(1 Pt 2):193-205.
5. Batlouni M. [Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2010; Apr;94(4):556-63.
6. Wang J, Xiong X, Feng B. Aspirin resistance and promoting blood circulation and removing blood stasis: current situation and prospectives. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2014;2014:954863.
7. Amer M, Bead VR, Bathon J, Blumenthal RS, Edwards DN. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with cardiovascular disease: a cautionary tale. *Cardiology in review*. 2010; Jul-Aug;18(4):204-12.

8. Zinkievich JM, George S, Jha S, Nandi J, Levine RA. Gastric acid is the key modulator in the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced ulceration in rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2010; Jul;37(7):654-61.
9. Inal S, Kabay S, Cayci MK, Kuru HI, Altikat S, Akkas G, et al. Comparison of the effects of dexketoprofen trometamol, meloxicam and diclofenac sodium on fibular fracture healing, kidney and liver: an experimental rat model. *Injury*. 2014; Mar;45(3):494-500.
10. Ungprasert P, Cheungpasitporn W, Crowson CS, Matteson EL. Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *European journal of internal medicine*. 2015; May;26(4):285-91.
11. Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*. 2000; Sep;119(3):706-14.
12. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New biology*. 1971; Jun 23;231(25):232-5.
13. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 1999; Aug 13;274(33):22903-6.
14. Miller SB. Prostaglandins in health and disease: an overview. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2006; Aug;36(1):37-49.
15. Patrono C, Baigent C. Low-dose aspirin, coxibs, and other NSAIDs: a clinical mosaic emerges. *Molecular interventions*. 2009; Feb;9(1):31-9.
16. Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, Lee JY, Sharma NP, Yuan C, et al. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; Jan 5;107(1):28-33.
17. Kirkby NS, Chan MV, Lundberg MH, Massey KA, Edmands WM, MacKenzie LS, et al. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 predicts

cyclooxygenase-2 in the lungs of LPS-treated mice but not in the circulation: implications for a clinical test. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013; Oct;27(10):3938-46.

18. Kummer CL, Coelho TC. [Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues.]. *Revista brasileira de anesthesiologia*. 2002; Jul;52(4):498-512.

19. Patrignani P, Patrono C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochimica et biophysica acta*. 2015; Apr;1851(4):422-32.

20. Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica et biophysica acta*. 2015; Apr;1851(4):414-21.

21. Aldrovandi M, Hammond VJ, Podmore H, Hornshaw M, Clark SR, Marnett LJ, et al. Human platelets generate phospholipid-esterified prostaglandins via cyclooxygenase-1 that are inhibited by low dose aspirin supplementation. *Journal of lipid research*. 2013; Nov;54(11):3085-97.

22. Camargo EG, Gross JL, Weinert LS, Lavinsky J, Silveiro SP. [Low-dose aspirin in patients with diabetes mellitus: risks and benefits regarding macro and microvascular complications]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2007; Apr;51(3):457-65.

23. Akyazi I, Eraslan E, Gulcubuk A, Ekiz EE, Cirakli ZL, Haktanir D, et al. Long-term aspirin pretreatment in the prevention of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013; May 21;19(19):2894-903.

24. Palkar MB, Singhai AS, Ronad PM, Vishwanathswamy AH, Boreddy TS, Veerapur VP, et al. Synthesis, pharmacological screening and in silico studies of new class of Diclofenac analogues as a promising anti-inflammatory agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2014; May 15;22(10):2855-66.

25. Troxler M, Dickinson K, Homer-Vanniasinkam S. Platelet function and antiplatelet therapy. *The British journal of surgery*. 2007; Jun;94(6):674-82.

26. Lim YJ, Dial EJ, Lichtenberger LM. Advent of novel phosphatidylcholine-associated nonsteroidal anti-inflammatory drugs with improved gastrointestinal safety. *Gut and liver*. 2013; Jan;7(1):7-15.
27. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *The New England journal of medicine*. 2001; Aug 9;345(6):433-42.
28. Chen S, Yang J, Wang H, Chao Y, Zhang C, Shen J, et al. Adenovirus encoding BMP-7 immobilized on titanium surface exhibits local delivery ability and regulates osteoblast differentiation in vitro. *Archives of oral biology*. 2013; Sep;58(9):1225-31.
29. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. *Journal of lipid research*. 2009; Apr;50 Suppl:S423-8.
30. Peskar BM, Maricic N, Gretzera B, Schuligoi R, Schmassmann A. Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. *Life sciences*. 2001; Nov 9;69(25-26):2993-3003.
31. Harris RC, Breyer MD. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *American journal of physiology Renal physiology*. 2001; Jul;281(1):F1-11.
32. Rouzer CA, Kingsley PJ, Wang H, Zhang H, Morrow JD, Dey SK, et al. Cyclooxygenase-1-dependent prostaglandin synthesis modulates tumor necrosis factor-alpha secretion in lipopolysaccharide-challenged murine resident peritoneal macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2004; Aug 13;279(33):34256-68.
33. Chen M, Boilard E, Nigrovic PA, Clark P, Xu D, Fitzgerald GA, et al. Predominance of cyclooxygenase 1 over cyclooxygenase 2 in the generation of proinflammatory prostaglandins in autoantibody-driven K/BxN serum-transfer arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008; May;58(5):1354-65.
34. Brune K, Hinz B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2004;33(1):1-6.

35. Cairns JA. The coxibs and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a current perspective on cardiovascular risks. *The Canadian journal of cardiology*. 2007; Feb;23(2):125-31.
36. Barudzic N, Turjacanin-Pantelic D, Zivkovic V, Selakovic D, Srejavic I, Joksimovic J, et al. The effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on oxidative stress in isolated rat heart. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013; Sep;381(1-2):301-11.
37. Murtaza G, Karim S, Najam-ul-Haq M, Ahmad M, Ismail T, Khan SA, et al. Interaction analysis of aspirin with selective amino acids. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014; Jan-Feb;71(1):139-43.
38. Kovacs EG, Katona E, Bereczky Z, Homorodi N, Balogh L, Toth E, et al. Evaluation of laboratory methods routinely used to detect the effect of aspirin against new reference methods. *Thrombosis research*. 2014; May;133(5):811-6.
39. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *The American journal of pathology*. 1999; Oct;155(4):1281-91.
40. Picot D, Garavito RM. Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure. *FEBS letters*. 1994; Jun 6;346(1):21-5.
41. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. 1996; Dec 19-26;384(6610):644-8.
42. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of lipid research*. 2009; Apr;50 Suppl:S29-34.
43. Flower RJ. The development of COX2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 03//print;2(3):179-91.
44. Lipsky PE. Defining COX-2 inhibitors. *The Journal of rheumatology Supplement*. 2000; Oct;60:13-6.
45. Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet (London, England)*. 2000; Feb 19;355(9204):646-8.

46. Hilario MO, Terreri MT, Len CA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *Jornal de pediatria*. 2006; Nov;82(5 Suppl):S206-12.
47. Carvalho WA, Carvalho RD, Rios-Santos F. [Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesics: therapeutic advances.]. *Revista brasileira de anesthesiologia*. 2004; Jun;54(3):448-64.
48. Cryer B, Mahaffey KW. Gastrointestinal ulcers, role of aspirin, and clinical outcomes: pathobiology, diagnosis, and treatment. *Journal of multidisciplinary healthcare*. 2014;7:137-46.
49. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. Prostaglandins and ulcer healing. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2005; Sep;56 Suppl 5:5-31.
50. Filaretova LP, Bagaeva TR, Morozova OY, Zelena D. The healing of NSAID-induced gastric lesion may be followed by small intestinal and cardiovascular side effects. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2011; Dec;62(6):619-25.
51. Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P, Nada R. Comparative gastrointestinal toxicity of selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Indian journal of experimental biology*. 2005; Jul;43(7):614-9.
52. Yokota A, Taniguchi M, Takahira Y, Tanaka A, Takeuchi K. Dexamethasone damages the rat stomach but not small intestine during inhibition of COX-1. *Digestive diseases and sciences*. 2007; Jun;52(6):1452-61.
53. Nantel F, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters KM, Giaid A. Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS letters*. 1999; Sep 3;457(3):475-7.
54. DeMaria AN, Weir MR. Coxibs--beyond the GI tract: renal and cardiovascular issues. *Journal of pain and symptom management*. 2003; Feb;25(2 Suppl):S41-9.
55. Moore N, Pollack C, Butkerait P. Adverse drug reactions and drug-drug interactions with over-the-counter NSAIDs. *Therapeutics and clinical risk management*. 2015;11:1061-75.

56. Ahmetaj-Shala B, Kirkby NS, Knowles R, Al'Yamani M, Mazi S, Wang Z, et al. Evidence that links loss of cyclooxygenase-2 with increased asymmetric dimethylarginine: novel explanation of cardiovascular side effects associated with anti-inflammatory drugs. *Circulation*. 2015; Feb 17;131(7):633-42.
57. Khan MA, Neckar J, Cummins B, Wahl GM, Imig JD. Azilsartan Decreases Renal and Cardiovascular Injury in the Spontaneously Hypertensive Obese Rat. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2014; May 20.
58. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998; Sep;12(12):1063-73.
59. Hao S, Hernandez A, Quiroz-Munoz M, Cespedes C, Vio CP, Ferreri NR. PGE(2) EP(3) receptor downregulates COX-2 expression in the medullary thick ascending limb induced by hypertonic NaCl. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014; Sep 15;307(6):F736-46.
60. Kaminska K, Szczylik C, Lian F, Czarnecka AM. The role of prostaglandin E2 in renal cell cancer development: future implications for prognosis and therapy. *Future oncology (London, England)*. 2014; Nov;10(14):2177-87.
61. Gonzalez AA, Green T, Luffman C, Bourgeois CR, Gabriel Navar L, Prieto MC. Renal medullary cyclooxygenase-2 and (pro)renin receptor expression during angiotensin II-dependent hypertension. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014; Oct 15;307(8):F962-70.
62. Curiel RV, Katz JD. Mitigating the cardiovascular and renal effects of NSAIDs. *Pain medicine (Malden, Mass)*. 2013; Dec;14 Suppl 1:S23-8.
63. Lomas AL, Grauer GF. The renal effects of NSAIDs in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 2015; May-Jun;51(3):197-203.
64. Gomez RA, Sequeira Lopez MLS. Who and where is the renal baroreceptor?: the connexin hypothesis. *Kidney international*. 2009; Mar;75(5):460-2.

65. Hunt RH, Bazzoli F. Review article: should NSAID/low-dose aspirin takers be tested routinely for H. pylori infection and treated if positive? Implications for primary risk of ulcer and ulcer relapse after initial healing. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004; Feb;19 Suppl 1:9-16.
66. Gargallo CJ, Sostres C, Lanás A. Prevention and Treatment of NSAID Gastropathy. *Current treatment options in gastroenterology*. 2014; Dec;12(4):398-413.
67. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of pain research*. 2015;8:105-18.
68. Dallob A, Hawkey CJ, Greenberg H, Wight N, De Schepper P, Waldman S, et al. Characterization of etoricoxib, a novel, selective COX-2 inhibitor. *Journal of clinical pharmacology*. 2003; Jun;43(6):573-85.
69. Nagi R, Yashoda Devi BK, Rakesh N, Reddy SS, Patil DJ. Clinical implications of prescribing nonsteroidal anti-inflammatory drugs in oral health care--a review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2015; Mar;119(3):264-71.
70. Bhala N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2013; Aug 31;382(9894):769-79.
71. McGettigan P, Henry D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *Jama*. 2006; Oct 4;296(13):1633-44.
72. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *The Journal of clinical investigation*. 2006; Jan;116(1):4-15.
73. Patrignani P, Tacconelli S, Bruno A, Sostres C, Lanás A. Managing the adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Expert review of clinical pharmacology*. 2011; Sep;4(5):605-21.

74. Laine L, Connors LG, Reicin A, Hawkey CJ, Burgos-Vargas R, Schnitzer TJ, et al. Serious lower gastrointestinal clinical events with nonselective NSAID or coxib use. *Gastroenterology*. 2003; Feb;124(2):288-92.
75. Kockaya EA, Selmanoglu G, Kismet K, Akay MT. Pathological and biochemical effects of therapeutic and supratherapeutic doses of celecoxib in Wistar albino male rats. *Drug and chemical toxicology*. 2010; Oct;33(4):410-4.
76. Steinhubl SR. Historical observations on the discovery of platelets, platelet function testing and the first antiplatelet agent. *Current drug targets*. 2011; Nov;12(12):1792-804.
77. Akagi Y, Nio Y, Shimada S, Aoyama T. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the antiplatelet effects of aspirin in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2011;34(2):233-7.
78. Roth GA, Gillespie CW, Mokdad AA, Shen DD, Fleming DW, Stergachis A, et al. Aspirin use and knowledge in the community: a population- and health facility based survey for measuring local health system performance. *BMC cardiovascular disorders*. 2014;14:16.
79. Akinwusi PO, Oluyombo R, Ogunro PS, Adeniji AO, Okunola OO, Ayodele OE. Low dose aspirin therapy and renal function in elderly patients. *International journal of general medicine*. 2013;6:19-24.
80. Hissett J, Folks B, Coombs L, Leblanc W, Pace WD. Effects of changing guidelines on prescribing aspirin for primary prevention of cardiovascular events. *Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM*. 2014; Jan-Feb;27(1):78-86.
81. Lin SE, Huang JP, Wu LZ, Wu T, Cui L. Prevention of osteopenia and dyslipidemia in rats after ovariectomy with combined aspirin and low-dose diethylstilbestrol. *Biomedical and environmental sciences : BES*. 2013; Apr;26(4):249-57.
82. Patrignani P, Tacconelli S, Piazzuelo E, Di Francesco L, Dovizio M, Sostres C, et al. Reappraisal of the clinical pharmacology of low-dose aspirin by comparing novel direct and traditional indirect biomarkers of drug action. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2014; Aug;12(8):1320-30.

83. Vaucher J, Marques-Vidal P, Waeber G, Vollenweider P. Cytokines and hs-CRP levels in individuals treated with low-dose aspirin for cardiovascular prevention: a population-based study (CoLaus Study). *Cytokine*. 2014; Apr;66(2):95-100.
84. Marcucci R, Cioni G, Giusti B, Fatini C, Rossi L, Pazzi M, et al. Gender and anti-thrombotic therapy: from biology to clinical implications. *Journal of cardiovascular translational research*. 2014; Feb;7(1):72-81.
85. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011; Apr;31(4):991-3.
86. Ghosh A, Dhumal VR, Tilak AV, Singh A, Pandey M, Bondekar AA. Effect of chronic administration of low dose aspirin on haloperidol induced catalepsy in rats. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2011; Jul;2(3):198-9.
87. Liu YW, Zhu X, Zhang L, Lu Q, Zhang F, Guo H, et al. Cerebroprotective effects of ibuprofen on diabetic encephalopathy in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2014; Feb;117:128-36.
88. Ozturk Bilgin O, Kumbul Doguc D, Altuntas I, Sutcu R, Delibas N. Effects of Subchronic Treatment with Ibuprofen and Nimesulide on Spatial Memory and NMDAR Subunits Expression in Aged Rats. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*. 2013; Fall;12(4):877-85.
89. Baracho NC, Guizelli GP, Carmello BL, Sanches Dde S, Silva FM, Reis JM, et al. Cardiovascular and hematologic effects produced by chronic treatment with etoricoxib in normotensive rats. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. 2009; May-Jun;24(3):206-10.
90. Bressan E, Tonussi CR. Antiinflammatory effects of etoricoxib alone and combined with NSAIDs in LPS-induced reactive arthritis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2008; Dec;57(12):586-92.

91. Dhull DK, Bhateja D, Dhull RK, Padi SS. Differential role of cyclooxygenase isozymes on neuronal density in hippocampus CA1 region of intracerebroventricular streptozotocin treated rat brain. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2012; Jan;43(1):48-51.
92. Fornai M, Antonioli L, Colucci R, Pellegrini C, Giustarini G, Testai L, et al. NSAID-induced enteropathy: are the currently available selective COX-2 inhibitors all the same? *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2014; Jan;348(1):86-95.
93. Fracon RN, Teofilo JM, Moris IC, Lamano T. Treatment with paracetamol, ketorolac or etoricoxib did not hinder alveolar bone healing: a histometric study in rats. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2010; Dec;18(6):630-4.
94. Maheshwari A, Badgujar L, Phukan B, Bodhankar SL, Thakurdesai P. Protective effect of Etoricoxib against middle cerebral artery occlusion induced transient focal cerebral ischemia in rats. *European journal of pharmacology*. 2011; Sep 30;667(1-3):230-7.
95. Mendes RT, Sordi R, Olchanheski LR, Jr., Machado WM, Stanczyk CP, Assreuy J, et al. Periodontitis increases vascular cyclooxygenase-2: potential effect on vascular tone. *Journal of periodontal research*. 2014; Feb;49(1):85-92.
96. Basselin M, Ramadan E, Chen M, Rapoport SI. Anti-inflammatory effects of chronic aspirin on brain arachidonic acid metabolites. *Neurochemical research*. 2011; Jan;36(1):139-45.
97. Renna NF, Vazquez MA, Lama MC, Gonzalez ES, Miatello RM. Effect of chronic aspirin administration on an experimental model of metabolic syndrome. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2009; Feb;36(2):162-8.
98. Smith JW, Al-Khamees O, Costall B, Naylor RJ, Smythe JW. Chronic aspirin ingestion improves spatial learning in adult and aged rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2002; Jan-Feb;71(1-2):233-8.
99. Shin JH, Lee CW, Oh SJ, Yun J, Lee K, Park SK, et al. Protective effect of silymarin against ethanol-induced gastritis in rats: role of sulfhydryls, nitric oxide and gastric sensory afferents. *Food and chemical toxicology : an*

international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2013; May;55:353-7.

100. Andrade SF, Antonioli D, Comunello E, Cardoso LG, Carvalho JC, Bastos JK. Antiulcerogenic activity of crude extract, fractions and populnic acid isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences*. 2006; May-Jun;61(5-6):329-33.

101. Ribeiro AR, Diniz PB, Estevam CS, Pinheiro MS, Albuquerque-Junior RL, Thomazzi SM. Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2013; May 20;147(2):383-8.

102. Rodrigues JA, Vanderlei ES, Silva LM, Araujo IW, Queiroz IN, Paula GA, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. *Pharmacological reports : PR*. 2012;64(2):282-92.

103. Ivanov M, Mihailovic-Stanojevic N, Grujic Milanovic J, Jovovic D, Markovic-Lipkovski J, Cirovic S, et al. Losartan improved antioxidant defense, renal function and structure of postischemic hypertensive kidney. *PloS one*. 2014;9(5):e96353.

104. Berger M, Santi L, Beys-da-Silva WO, Oliveira FM, Caliari MV, Yates JR, 3rd, et al. Mechanisms of acute kidney injury induced by experimental *Lonomia obliqua* envenomation. *Archives of toxicology*. 2014; May 6.

105. Iwamoto J, Saito Y, Honda A, Matsuzaki Y. Clinical features of gastroduodenal injury associated with long-term low-dose aspirin therapy. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013; Mar 21;19(11):1673-82.

106. Nishino M, Sugimoto M, Uotani T, Yamade M, Sahara S, Ichikawa H, et al. Association of gastric mucosal injury severity with platelet function and gastric pH during low-dose aspirin treatment. *Digestion*. 2013;88(2):79-86.

107. Soares J. Low-dose aspirin reduces gastro-protective properties of COX-2 selective inhibitors. *Clinical drug investigation*. 2009;29 Suppl 2:26-8.

108. Venerito M, Treiber G, Wex T, Kuester D, Roessner A, Di Mario F, et al. Effects of low-dose aspirin on gastric erosions, cyclooxygenase expression and

mucosal prostaglandin-E2 do not depend on *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2006; Apr 15;23(8):1225-33.

109. Laine L, Maller ES, Yu C, Quan H, Simon T. Ulcer formation with low-dose enteric-coated aspirin and the effect of COX-2 selective inhibition: a double-blind trial. *Gastroenterology*. 2004; Aug;127(2):395-402.

110. Weil J, Colin-Jones D, Langman M, Lawson D, Logan R, Murphy M, et al. Prophylactic aspirin and risk of peptic ulcer bleeding. *BMJ (Clinical research ed)*. 1995; Apr 1;310(6983):827-30.

111. Yeomans ND, Hawkey CJ, Brailsford W, Naesdal J. Gastroduodenal toxicity of low-dose acetylsalicylic acid: a comparison with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Current medical research and opinion*. 2009; Nov;25(11):2785-93.

112. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; Dec 15;90(24):11693-7.

113. Patrignani P, Capone ML, Tacconelli S. Clinical pharmacology of etoricoxib: a novel selective COX2 inhibitor. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2003; Feb;4(2):265-84.

114. Lanas A, Garcia-Rodriguez LA, Arroyo MT, Gomollon F, Feu F, Gonzalez-Perez A, et al. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut*. 2006; Dec;55(12):1731-8.

115. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. *Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*. *Jama*. 2000; Sep 13;284(10):1247-55.

116. Lanas A, Bajador E, Serrano P, Fuentes J, Carreno S, Guardia J, et al. Nitrovasodilators, low-dose aspirin, other nonsteroidal antiinflammatory drugs,

and the risk of upper gastrointestinal bleeding. *The New England journal of medicine*. 2000; Sep 21;343(12):834-9.

117. Sorensen HT, Mellemkjaer L, Blot WJ, Nielsen GL, Steffensen FH, McLaughlin JK, et al. Risk of upper gastrointestinal bleeding associated with use of low-dose aspirin. *The American journal of gastroenterology*. 2000; Sep;95(9):2218-24.

118. Kawasaki K, Kurahara K, Yanai S, Kochi S, Fuchigami T, Matsumoto T. Low-Dose Aspirin and Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Increase the Risk of Bleeding in Patients with Gastroduodenal Ulcer. *Digestive diseases and sciences*. 2015; Apr;60(4):1010-5.

119. Snowden S, Nelson R. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on blood pressure in hypertensive patients. *Cardiology in review*. 2011; Jul-Aug;19(4):184-91.

120. Dreischulte T, Morales DR, Bell S, Guthrie B. Combined use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with diuretics and/or renin-angiotensin system inhibitors in the community increases the risk of acute kidney injury. *Kidney international*. 2015; Aug;88(2):396-403.

121. Zhang J, Ding EL, Song Y. Adverse effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on renal and arrhythmia events: meta-analysis of randomized trials. *Jama*. 2006; Oct 4;296(13):1619-32.

ANEXO A

Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do Uso Animal
Universidade Estadual de Ponta Grossa – **Processo CEUA 040/2014/**
Protocolo UEPG 16856/2014



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 040/2014

Protocolo UEPG – 16856/2014

Título – Avaliação do efeito gástrico, renal e no tempo de sangramento de anti-inflamatórios com diferentes seletividades (COX-1 e COX-2) em ratos submetidos à baixa dose de aspirina

Data de Entrada – 7/10/2014

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 7/10/2014 a 7/10/2016

Considerações

Prezado Professor Gilson César Nobre Franco e mestranda Marcella Goetz Moro:

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 66 (sessenta e seis) ratos wistar de seis a oito semanas.

Situação: APROVADO.

Ponta Grossa, 7 de novembro de 2014.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROFESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof.ª Dra. Maria Marta Casati
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP: 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria – anexo a PROFESP
Fone: (042) 3220-3264