

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica  
Mestrado Profissional - Inovação Biofarmacêutica

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPLEXO  
DICLOFENACO-ZINCO SOBRE A FUNÇÃO  
RENAL EM RATOS**

**ELISABETE COSTA REIS DUTRA**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Belo Horizonte

2011

**ELISABETE COSTA REIS DUTRA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPLEXO  
DICLOFENACO-ZINCO SOBRE A FUNÇÃO  
RENAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Inovação Biofarmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Biofarmacêutica, na área de Concentração de Ensaio Pré-Clínicos, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Maria Aparecida Ribeiro Vieira.

Belo Horizonte

2011

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Renal “Professor Fernando Alzamora”, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Maria Aparecida Ribeiro Vieira.

Dedico esse trabalho às minhas amadas filhas Ana Luiza e Thaís, razão da minha existência, de quem cerceei momentos de convivência durante a execução desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, energia suprema que nos presenteia com a diversidade da vida.

À Profa Maria Aparecida Ribeiro Vieira por ter me recebido tão prontamente como sua orientanda, pela orientação e ensinamentos que proporcionaram a conclusão desse trabalho.

Aos meus pais Eloy Vieira Dutra e Eliete Costa Reis Dutra que, embora não mais compartilhem fisicamente esse mundo conosco, sempre foram uma fonte de valores, incentivos e apoio incondicional.

Ao meu marido, Carlos Alberto Tagliati, pelo incentivo, apoio, companheirismo e disponibilidade durante esse trabalho. A ele e minhas filhas Ana Luiza e Thaís, meu amor incondicional e dedicação para sempre e por serem tão especiais em minha vida.

Aos meus queridos irmãos Marcos e Maria Lígia, por partilharem comigo bons e maus momentos.

Ao meu cunhado Marcus Pestana pela oportunidade de aprender mais sobre a saúde de uma forma tão ampla e apaixonante.

Ao Prof. Ricardo José Alves por sua imensa boa vontade e presteza na síntese do complexo diclofenaco –zinco.

Ao Prof. Marcelo Vidigal Caliari por sua disponibilidade e ajuda na execução e interpretação das análises morfológicas.

À Roseli Martins por sua grande contribuição e disponibilidade pessoal em todo o trabalho, além de sua amizade, carinho e dedicação.

Ao Laboratório Central da UFMG pela boa vontade em nos receber para executarmos as dosagens laboratoriais, em especial, à Dalva, Lúcia, Márcia Izabel, Antônia Regina, Christian, Mônica, Camila e todas as pessoas que colaboraram nesse trabalho.

Ao Gustavo Cosenza pela importante participação nesse trabalho.

Ao Lúcio e Flavinha pela contribuição e boa vontade.

À Elza Maria Mendes Pinto que tem me mostrado com seu profissionalismo, carinho e dedicação que nós somos o limite de nossas próprias vidas.

Às minhas amigas Zaida, Leila, Suzane, Sandrinha, Silvana, Laiz e Àurea, grandes incentivadoras e parceiras dessa vida.

À Helidea, parceira de tantos momentos, pelo aprendizado, incentivo e grande amizade.

Ao Eugênio Vilaça Mendes por me ensinar que só envelhecemos quando paramos de estudar.

À Darissa e Cássio pelas palavras de carinho em todos os momentos e suas disponibilidades em ajudar.

A toda minha equipe de trabalho da Superintendência de Contratação de Serviços de Saúde da SES/MG que tanto me ouviram sobre todo esse trabalho.

A todos os meus familiares e a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Aos animais, pela vida em prol da ciência.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AAS: ácido acetilsalicílico
- ACL: aclimatação
- AcZn: acetato de zinco
- AIE: antiinflamatórios esteróides
- AINE: antiinflamtório não esteróide
- AR: artrite reumatóide
- AUC: área sob a curva
- BCS: Sistema de Classificação Biofarmacêutica
- BUN: uréia
- CEBIO: Centro de Bioterismo
- CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CMC: carboximetilcelulose
- COX: ciclooxigenase
- CTIT: Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica
- CyP: citocromo P450
- DCF: diclofenaco
- DCF Zn: complexo diclofenaco – zinco
- D0: dia zero
- D5: dia cinco
- D8: dia oito
- FE: fração de excreção
- FU: fluxo urinário
- Gama GT: gama glutamil transferase
- GM: gentamicina
- IL: interleucina
- INPI: Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

- IRA: injúria renal aguda-
- MT: metalotioneínas
- NTA: necrose tubular aguda
- OA: osteoartrite
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- Osm: osmolalidade
- PG: prostaglandina
- QF: quantidade filtrada
- QE: quantidade excretada
- RFG: ritmo de filtração glomerular
- SAL: salina
- S.C.: subcutâneo
- $t_{1/2\beta}$ : tempo de meia vida de eliminação
- TBX: tromboxanos
- TMT: tratamento
- TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa
- Vd: volume de distribuição
- Zn: zinco

## RESUMO

O Diclofenaco (DCF) é um dos antiinflamatórios mais prescritos em todo o mundo devido à sua atividade analgésica, antipirética e antiinflamatória. Porém, a irritação gástrica é um dos principais efeitos adversos causados pelo seu uso. Com o objetivo de diminuir esse efeito, foi sintetizado o complexo diclofenaco-zinco (DCF Zn), complexo cujo depósito de patente foi feito pela CTIT/UFMG. Nesse cenário, o presente trabalho se propôs a comparar o efeito do DCF livre, DCF associado ao acetato de zinco (AcZn) e do complexo DCF Zn sobre a função renal de ratos com necrose tubular aguda (NTA) induzida por gentamicina (GM). Para investigarmos a nefrotoxicidade do referido medicamento, inicialmente, a NTA foi induzida (5 dias) com GM, em ratos mantidos individualmente em gaiolas metabólicas, os quais foram posteriormente tratados, por 7 dias, com os compostos sob estudo. Amostras de urina e sangue foram coletadas ao final da administração de GM (D0) e no 4º (D4) e 8º (D8) dias pós-início do tratamento. Essas amostras foram posteriormente submetidas a análises laboratoriais. Ao término do tratamento os animais foram sacrificados e o rim direito foi removido e destinado para análise morfológica. Na NTA causada pela GM pode-se observar, entre outros, aumento da concentração plasmática da creatinina, redução da filtração glomerular, aumento do fluxo urinário, aumento da excreção de água e aumento da excreção de Na<sup>+</sup> e de K<sup>+</sup>. A GM não afetou parâmetros como peso corporal e ingestão de água, que também não sofreram qualquer alteração durante o tratamento com DCF livre, DCF associado ao AcZn (3 doses distintas). O complexo DCF Zn não produziu mudanças significativas nos parâmetros renais que já se encontravam alterados pela GM. Além do mais, os efeitos do DCF Zn, na maioria dos parâmetros analisados não foram diferentes daqueles obtidos com o DCF livre ou DCF associado ao AcZn. Porém, no grupo tratado com o complexo DCF Zn, a microalbuminúria foi reduzida e houve melhoria dos danos renais produzidos pela GM. Estas observações indicam que o complexo DCF Zn poderia ser um antiinflamatório de escolha em situação patológica onde há disfunção renal similar àquela investigada neste estudo. Uma outra vantagem exibida pelo complexo DCF Zn é que, por apresentar formulação farmacêutica única, poderia facilitar e estimular uma melhor adesão ao tratamento prescrito.

Palavras-chave: diclofenaco-zinco; função renal; ratos.

## ABSTRACT

Diclofenac (DCF) is one of the most commonly prescribed anti-inflammatory medicines in the world due to its analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory action. However, gastric irritation is one of the main side effects caused by its use. Aimed at reducing this effect, the zinc-diclofenac (Zn DCF) compound, a deposit patented by CTIT/UFMG, was synthesized. In this light, the present work aims to draw a comparison among the effects of free DCF, DCF associated with zinc acetate (ZnAc), and the Zn DCF complex concerning the renal function of rats with acute tubular necrosis (ATN) induced by gentamicin (GM). To investigate the nephrotoxicity of this medicine, first, the ATN was applied with GM for 5 days in rats maintained individually in metabolic cages, which were later treated for 7 days with the studied compounds. Urine and blood samples were collected after having administered the GM (D0) and on the 4<sup>th</sup> (D4) and 8<sup>th</sup> (D8) days after the beginning of treatment. These samples later underwent laboratory analyses. After having finished the treatment, the animals were sacrificed, and the right kidney was removed and sent for morphological analysis. In the ATN caused by GM, one can observe, among other factors, an increase in the plasmatic concentration of creatinine, a reduction in the glomerular filtration, an increase in the urinary flow, an increase in the excretion of water, and an increase in the excretion of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. The GM did not affect parameters such as body weight and ingestion of water, which also showed no changes during treatment with free DCF and DCF associated with ZnAc (3 distinct doses). The DCF compound produced no significant changes in the renal parameters, which had already been altered by GM. In addition, the effects of the Zn DCF, in the majority of analyzed parameters, proved to be no different than those obtained with free DCF or DCF associated with Zn Ac. Nevertheless, in the group treated with the Zn DCF compound, the microalbuminurium was reduced and the renal damage produced by GM was improved. These observations indicate that the Zn DCF compound may well represent a anti-inflammatory medicine of choice in pathological situations where there is a renal dysfunction similar to that investigated in the present study. Another advantage of the Zn DCF compound is that, as it presents a unique pharmaceutical formulation, this may well facilitate and stimulate a better adhesion to the prescribed treatment.

Keywords: zinc-diclofenac; renal function; rats.

# 1 INTRODUÇÃO

Historicamente, os antiinflamatórios não esteróides (AINE) remetem ao uso da casca de salgueiro na pré-história e avança até a fronteira dos recentes avanços tecnológicos com indicações para o uso de outros compostos antiinflamatórios (LUZ, 2003; JONES, 2001).

Os assírios e os egípcios usavam as folhas de salgueiro para o alívio da dor e da inflamação associadas aos ferimentos (LUZ, 2003).

Em 1763, o reverendo Edmund Stone, na Inglaterra, descreveu ao presidente da *Royal Society* o sucesso da casca de salgueiro na cura da febre. Como o salgueiro crescia nas áreas pantanosas úmidas, “onde as febres eram muito comuns”, Stone deduziu que a planta provavelmente possuía propriedades curativas adequadas a esta condição (LUZ, 2003; JONES, 2001).

Leroux (1829) isolou, pela primeira vez, o glicosídeo salicina em sua forma pura, extraído da casca do salgueiro e também demonstrou seu efeito antipirético (LUZ, 2003).

O salicilato de sódio foi usado pela primeira vez no tratamento da febre reumática e, como antipirético, em 1875. As descobertas de seus efeitos uricosúricos e da sua utilidade no tratamento da gota vieram logo depois (LUZ, 2003; JONES, 2001).

A partir do ácido acetilsalicílico (AAS), outros agentes antiinflamatórios foram descobertos. O ibuprofeno, por exemplo, foi o primeiro AINE não derivado do AAS identificado a partir de centenas de compostos descobertos pela *Boots Company*, no início dos anos 50 (JONES, 2001).

Os AINE constituem uma importante classe de medicamentos, de grande interesse clínico e elevado consumo devido à sua atividade analgésica, antipirética e antiinflamatória. Seu uso é muito difundido em todo o mundo e continua a crescer. Em 1995, sua comercialização alcançava a cifra de 2,2 bilhões de dólares, com 73 milhões de prescrições anuais em todo o mundo. Esses fármacos se encontram entre os mais prescritos dentre todos os agentes terapêuticos no mundo (ESTÉVE, 2009; WECK et al., 2009; LUZ, 2003; JONES, 2001). Segundo dados relatados por

Tamblyn et al. (1997), a cada ano, 70 milhões de prescrições são dispensadas nos Estados Unidos, 20 milhões na Inglaterra e 10 milhões no Canadá.

As prescrições dos AINE normalmente ocorrem na atenção primária, principalmente para artrite, osteoartrite, espondilite anquilosante, entre outras. São também indicados para reduzir a dor de intensidade leve a moderada, incluindo a da dismenorréia primária e a da enxaqueca e a febre. A propriedade de promover hipercalemia tem sido aproveitada no tratamento da síndrome de Bartter (LUZ, 2003; HAWKEY et al., 2000; FUCHS & WANNAMACHER, 1998).

Vane (1971) foi o primeiro a propor que os efeitos terapêuticos e colaterais dos AINE resultavam da inibição da enzima cicloxigenase por estes compostos. Assim, a cicloxigenase constitutiva (COX-1) reduz a síntese de prostaglandinas, diminuindo a intensidade do processo inflamatório e, conseqüentemente, a nocicepção periférica.

A inibição da COX-1 é, em parte, responsável por alguns efeitos adversos dos AINE, tais como a toxicidade renal e gastrointestinal. Independente da capacidade de inibir a síntese de prostaglandinas, a inibição direta da ativação da função dos neutrófilos, concorre para os efeitos anti-reumáticos. Talvez isso ocorra por inibição de processos associados à membrana (KUMMER, 2002; YAKSH et al., 2001; DAHL & AEDER, 2000) .

Considerando o aspecto qualitativo, os AINE apresentam efeitos adversos semelhantes, variando quanto à intensidade e prevalência dos mesmos. Os principais efeitos colaterais relacionados a esse grupo de fármacos são ulceração e intolerância gastrointestinal, bloqueio da agregação plaquetária, inibição da motilidade uterina, inibição da função renal mediada por prostaglandinas e reações de hipersensibilidade (LUZ, 2003; JONES, 2001; FUCHS & WANNAMACHER, 1998).

O cetoprofeno e o piroxicam foram considerados fármacos de alto risco para o desenvolvimento de eventos adversos gastrointestinais; por outro lado, o ibuprofeno e o diclofenaco (DCF) foram considerados como de baixo risco. Os demais AINE foram considerados de risco intermediário para desenvolvimento do

referido evento em estudos realizados por Bergman et al. (2000), em países europeus.

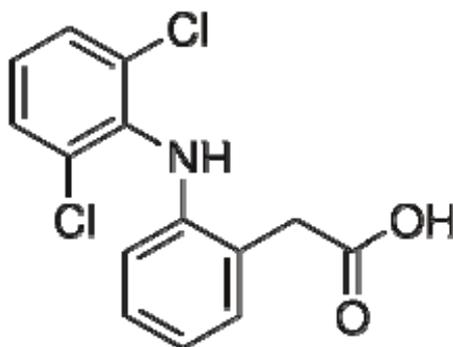
### 1.1 Diclofenaco

O diclofenaco de sódio é um AINE, da classe do ácido fenilacético, sendo largamente prescrito para o tratamento das doenças inflamatórias (GIAGOUDAKIS; MARKANTONIS, 1998). Este agente foi sintetizado por meio de modelagem molecular na busca de um AINE com elevada atividade e tolerabilidade (AGUIAR, 2009; MARTINS, 2006). Possui fracas propriedades ácidas (pKa por volta de 4) e sua solubilidade depende do pH do meio, sendo ligeiramente solúvel em água, muito rapidamente solúvel em tampão fosfato, pH 6,8 e praticamente insolúvel em ácido clorídrico, pH 1,2 (AGUIAR, 2009).

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), o DCF é um fármaco de classe II, ou seja, apresenta alta permeabilidade, mas com a solubilidade em meio aquoso insuficiente para dissolver completamente no trato gastrointestinal (*Guidance for Industry*, 2000).

A estrutura elementar do DCF é composta por um grupo ácido fenilacético, um grupo amino secundário e um anel fenílico, onde as duas posições orto deste anel estão ocupadas por átomos de cloro. Esse composto apresenta a constante de acidez igual a 4,0 e o coeficiente de partição n-octanol/água de 13,4 (SANTOS, 2001; SALLMANN, 1986; MENESSÉ et al., 1978).

A molécula de DCF, analisada ao raio-X, mostra um ângulo de torção ( $\alpha$ ) entre os dois anéis aromáticos de 69 graus e uma ligação de hidrogênio intramolecular ( $\delta$ ) entre o oxigênio da carboxila e o hidrogênio amino (SALLMANN, 1986; MENESSÉ et al., 1978).



## DICLOFENACO

O DCF é comercializado no mercado brasileiro na forma farmacêutica de drágeas, comprimidos dispersíveis, suspensão, injetável, gel, supositório e gotas (KUMMER, 2002).

### 1.1.1 Propriedades farmacocinéticas

A maioria dos AINE é rápida e completamente absorvida no trato gastrointestinal, com picos de concentração plasmática ocorrendo entre 2-3 h (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2005).

O DCF possui rápida absorção por via oral sendo, sua meia-vida de eliminação, de 1 a 2 h. Seu efeito terapêutico é consideravelmente mais longo que a meia-vida plasmática. Acumula-se no líquido sinovial após a administração, o que pode explicar o efeito terapêutico ser consideravelmente mais longo que a meia-vida plasmática (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2005).

O DCF pode ser administrado por outras vias como a tópica, intravenosa, intramuscular e retal (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2005).

O uso do AINE com a ingestão de alimentos tende a retardar a absorção do medicamento, afetando o pico de concentração da droga (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2005).

O DCF é rapidamente absorvido após administração oral e parenteral e é diretamente proporcional à dose, quando administrado entre 25-150 mg. Sua dose usual é de 50 mg, 3 vezes ao dia, ou 75 mg duas vezes ao dia. A administração de

doses múltiplas produz características de absorção similar às de dose única (CARVALHO, 2010; BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2005; SANTOS, 2001).

Há um substancial efeito de primeira passagem, de modo que a disponibilidade sistêmica do DCF é de 50% (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006). Não foram observadas alterações significativas na absorção do referido medicamento quando comparadas em estado patológico ou devido a diferenças de idade (CROOK et al., 1982).

Quando se administra 75 mg de DCF, por via intramuscular, as concentrações plasmáticas máximas são atingidas entre 10 e 22 min. A área sob a curva de concentração plasmática (AUC), alcançada após a administração parenteral da droga, é de aproximadamente o dobro da área sob a curva obtida após administração da mesma dose por via oral. Atribui-se essa diferença ao metabolismo de primeira passagem que ocorre após a administração oral da droga (CARVALHO, 2010).

A administração de solução de DCF mostra rápida absorção, com tempo de concentração máxima (T<sub>max</sub>) variando entre 10 e 40 min. Após dose única, na forma de comprimido de liberação entérica, supositórios ou soluções, o DCF é rapidamente absorvido com T<sub>max</sub> observado entre 1,5 e 2,0 h após a administração da droga (DEGEN et al., 1988; JOHN, 1979).

Sendo o DCF um ácido fraco, buscou-se alternativas em suas formulações para se obter uma maior rapidez na sua absorção e, conseqüentemente, na sua atividade farmacológica. A suspensão do sal de potássio, por exemplo, apresenta alta taxa de absorção com correspondente aumento da concentração plasmática, antecipando o efeito analgésico, o que é muito desejável na pirexia, processos inflamatórios orais e dismenorréia (MENDES et al., 1994).

A formulação dispersível do DCF apresenta T<sub>max</sub> menor, quando comparado com a formulação de liberação entérica (MACIÁ et al., 1995).

Na busca de redução das reações adversas, maximização do efeito local e minimização da toxicidade sistêmica, Pereira et al. (2006), demonstraram resultados favoráveis aos AINE de uso tópico com alívio da dor e melhoria da função e rigidez articular. A quantidade de DCF sódico absorvida através da pele é

proporcional ao tempo de contato e à área da pele coberta com o mesmo e depende da dose tópica total e da hidratação da pele (Novartis Pharma Brasil, São Paulo, Brasil).

Após absorção, o DCF se liga às proteínas plasmáticas na proporção de 99,7% ficando confinado no compartimento central. Isso se reflete por seu baixo volume de distribuição ( $V_d = 0,1$  a  $0,2$  L/Kg) (CARVALHO, W.A., 2010).

O seu *clearance* e o  $V_d$  são de 350 mL/min e 550 mL/kg, respectivamente (DAVIES & ANDERSON, 1997).

Como o DCF apresenta-se altamente ligado às proteínas plasmáticas, este poderá deslocar outros medicamentos do sítio de ligação, como é o caso do uso concomitante com o metotrexato, com conseqüente aumento do nível sanguíneo do último (SECOLI & LEBRÃO, 2009; SANTOS, 2001).

Altas concentrações de DCF foram detectadas no fluido e tecidos sinoviais em pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite (BENSON et al., 1985; LIAUW et al., 1985; FOWLER et al., 1983).

Após administrações oral, retal e intramuscular de DCF, a  $C_{max}$  no líquido sinovial foi atingida 2 a 4 h após a  $C_{max}$  plasmática. O fluido sinovial apresenta  $C_{max}$  com valores baixos, quando comparados com o  $C_{max}$  plasmática. A meia-vida de eliminação ( $t_{1/2\beta}$ ) é três vezes maior no líquido sinovial do que no plasma, onde 12 a 24 h após a administração, a concentração no fluido sinovial é mais alta que no plasma (BENSON et al., 1985; LIAUW et al., 1985).

Segundo estudos realizados por Fowler et al. (1983), a  $C_{max}$  plasmática foi atingida 3 h após a administração e caiu para 90% dentro de 2 h após repetidas doses do DCF e com a concentração no estado de equilíbrio. No fluido sinovial, a concentração apresentou menor variação e elevação após 4 h após a administração da dose, quando comparada com o plasma. A proporção de acúmulo do medicamento no líquido sinovial em relação ao plasma é de 3:1.

Benson et al. (1985), avaliaram a cinética do DCF em pacientes com osteoartrite e artrite reumatóide através das concentrações do medicamento no líquido sinovial. O pico no fluido sinovial foi alcançado 3 a 4 h após a administração de uma única dose do fármaco, apresentando altas concentrações neste fluido e no plasma após esse tempo. Após múltiplas doses, a concentração no fluido sinovial permaneceu aumentada por 12 h, sendo cinco vezes mais concentrada no fluido do que no plasma.

A alta fração de DCF livre deve ser explicada pela baixa concentração de albumina no líquido sinovial (CHAN et al., 1987).

O DCF sofre metabolização hepática pelo citocromo P450 (CYP), transformando-se em 4-hidroxiclofenaco, principal metabólito, e outros produtos hidroxilados. Após hidroxilação, sofre conjugação com ácido glicurônico e com sulfato (CARVALHO, W.A., 2010; FOWLER, 1979). Esse metabólito apresenta atividade antiinflamatória e antipirética de cerca de 30% em modelos animais (FOWLER, 1983; MENASSÉ et al., 1978).

A biodisponibilidade do DCF aumenta linearmente após administração de doses terapêuticas entre 25 e 150 mg, pelas vias oral, retal e muscular. Entretanto, drogas utilizadas pelas vias oral e retal sofrem o efeito de primeira passagem pelo fígado, que reduz sua biodisponibilidade em 50% (CARDOSO et al., 2002).

Estudos avaliando a biodisponibilidade do DCF administrado por via muscular em grupos que receberam doses de 50 e 75 mg, sugerem que a biodisponibilidade deste fármaco esteja diretamente relacionada ao seu efeito analgésico e que exista um efeito teto acima do qual o aumento da biodisponibilidade da droga não esteja associado com a melhora na qualidade da analgesia pós-operatória (CARDOSO et al., 2002).

O DCF é eliminado na urina (65%) e através da bile (35%). Menos de 1% da droga é excretado na urina de forma inalterada (CARVALHO, W.A., 2010). A eliminação é rápida, cerca de 90% da depuração acontecendo entre 3 e 4 h (JOHN, 1979).

Após a administração oral ou intravenosa do DCF, aproximadamente 61% da dose injetada foram excretados na urina e 30% nas fezes (JOHN, 1979).

Foi relatado que os metabólitos mono e di-hidroxi apresentam  $t_{1/2\beta}$  similar à do DCF, aproximadamente 1 a 4 h (DEGEN et al., 1988).

O DCF também é mais seguro para as mães que estão amamentando, já que a quantidade do mesmo encontrado no leite é pequena e não oferece risco para os lactentes (PELOSO, 1996; OSTENSEN & HUSBY, 1985). A falta de concentração apreciável do fármaco no leite materno pode ser atribuída à alta porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas e o baixo pH do leite materno, quando comparado com o plasma. Nesse estudo, a exposição dos recém nascidos ao DCF, via leite materno, parece ser mínima (FOWLER, 1983).

## **1.1.2 Avaliação pré-clínica**

### *1.1.2.1 Atividade antiinflamatória*

O DCF mostrou sua eficácia como agente antiinflamatório em modelo animal incluindo processo inflamatório em edema de pata estimulado por carragenina, caolin ou mostarda (RODRIGUES, 2007; NAKAEMA et al., 2005; MENASSÉ et al., 1978). Além disso, houve diminuição significativa do número de leucócitos no grupo de animais com processo inflamatório provocado por fio de catagute no tecido subcutâneo de ratos (FATURETO et al., 1989), além de diminuir a formação de fibras colágenas na cicatrização pós operatória da parede abdominal de ratos e inibir a formação de tecido granulomatoso induzido por implante de discos de algodão e a permeabilidade vascular induzida por plaquetas humanas em ratos (TOGNINI, 1998; DORIETO DE MENEZES & CATANZARO-GUIMARÃES, 1985). O DCF também apresentou atividade antiinflamatória em ratos com artrite (MENASSÉ et al., 1978).

### *1.1.2.2 Atividade antinociceptiva*

O DCF apresentou ampla ação antinociceptiva, avaliada em experimentos animais, induzida por ácido etacrínico, ácido acético e fenilbenzoquinona (TOGNINI et al., 1998; SCHOLER, 1986; MENASSÉ et al., 1978).

É uma droga de grande valor na analgesia pós-operatória. Estudos em analgesia pós-cesariana indicam que tanto a necessidade de opióides quanto os escores de dor podem ser diminuídos quando o DCF é administrado em diferentes doses e por diferentes vias (CARDOSO et al., 2002; CARDOSO et al., 1998; LUTHMAN et al., 1994).

#### *1.1.2.3 Atividade antipirética*

O DCF apresentou eficácia na prevenção da febre durante a endotoxemia experimental em eqüinos (ROSA et al., 2003).

Machado (2008) demonstrou que o DCF aboliu a resposta febril induzida pelo lipopolissacarídeo de *E. coli*, em ratos, enquanto que o paracetamol apenas a reduziu.

#### *1.1.2.4 Efeitos sobre a cascata do ácido araquidônico*

O ácido araquidônico apresenta papel regulador chave na fisiologia celular e é liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da enzima fosfolipase A2, a qual pode ser ativada por diversos estímulos (químico, inflamatório, traumático, mitogênico). É convertido a prostaglandinas (PGs) por enzimas denominadas cicloxigenases sendo que pelo menos 2 tipos desta enzima já se encontram descritas: a cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2) (KUMMER & COELHO, 2002).

A maioria dos AINE, dentre eles o DCF, exerce seus efeitos antiinflamatórios através da inibição da atividade das enzimas COX, resultando em formação diminuída dos precursores de PGs e tromboxanos (TBX) a partir do ácido araquidônico (PGG2 e PGH2). Esse mecanismo é a base de seus efeitos terapêuticos bem como de sua toxicidade, pois grande parte dos AINE disponíveis atualmente inibe tanto a atividade da COX-1, constitutiva, encontrada nos vasos sanguíneos, estômago e rins, responsável pelos efeitos fisiológicos das PGs em sítios gástricos e renais), quanto da COX-2 (induzida na presença de inflamação). A ação dos AINE sobre as ciclooxigenases é reversível para a maioria dos mesmos

(LUZ, T.C.B., 2003; KUMMER & COELHO, 2002; JONES, 2001; FUCHS & WANNAMACHER, 1998).

O DCF mostrou importante redução da síntese de PGs ( $\text{PGI}_2$ ) e TBX, em vesícula seminal bovina, vesícula seminal de ovelha, macrófagos e células polimorfonucleares de ratos. Também foi constatado em ratos e leucócitos humanos que altas concentrações de DCF reduz a formação de produtos da via da lipooxigenase. Isto sugere que o fenômeno se deve à diminuição da biodisponibilidade intracelular do ácido araquidônico (KU et al., 1985; TAYLOR & SALATA, 1976).

A administração de 200 mg de DCF, via oral, em doses divididas por mais de um dia, reduziu significativamente  $\text{PGE}_2$  e  $\text{TBXB}_2$  no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (SEPPALA et al., 1985).

### **1.1.3 Avaliação clínica**

A posologia recomendada para o uso do DCF é de 75 a 150 mg, em doses divididas ao longo do dia. Esse medicamento está presente no mercado na forma de sal livre, sal sódico e sal potássico (REINER V. et al., 2001; MARZO A et al., 2000; MCNELLY, W; GOA K.L., 1999).

A formulação de liberação gradativa de 100 mg/dia em dose única, associou eficácia terapêutica com comodidade posológica, favorecendo a aderência do paciente ao tratamento. Essas preparações, entretanto, não apresentaram menor intensidade de efeitos adversos no trato gastrointestinal (GARGOT et al., 1995; FIGUEIRAS et al., 1994; ROSSI, E., 1986).

Em pediatria, o DCF é bastante utilizado e apresenta eficácia clínica comprovada. As dosagens normalmente utilizadas para o tratamento do fenômeno álgico encontram-se entre 0,3-2 mg/kg/dose. É importante a utilização de dosagens adequadas, pois, na prática, freqüentemente ocorre utilização de doses subterapêuticas, pelos familiares, o que leva à conclusão errônea de ausência de eficácia da medicação. O perfil cinético da dose intravenosa de DCF, em crianças,

como pré-operatório após infusão por 5 e 15 min, mostrou-se aumentado duas vezes na depuração e o Vd cinco vezes maior, com similar  $t_{1/2\beta}$  terminal, quando comparados com adultos (GHERPELLI, J. L. D., 2002; HAMALAINEN et al., 1997; KORPELA & OLKKOOLA, 1990).

Entre os diversos AINE utilizados atualmente, o DCF sódico se destaca para uso em condições dolorosas crônicas e agudas, inflamação pós-operatória e pós-traumática, aliviando a dor e diminuindo a reação inflamatória e o edema (MULLER et al., 2004 ; TODD, P. A.; SORKIN, E. M., 1988; KANTOR, T. G., 1986).

A administração do DCF, por via muscular, promove melhor analgesia pós-operatória do que por via retal (CARDOSO et al., 2002).

Os AINE, assim como outros agentes terapêuticos, também podem apresentar interações medicamentosas. Dentre as mais importantes estão a redução ou reversão dos efeitos anti-hipertensivos de diuréticos, beta-bloqueadores adrenérgicos e inibidores da enzima conversora de angiotensina I, interações estas, observadas com a administração simultânea de AINE. O mecanismo da interação não está completamente elucidado, mas acredita-se que decorra da inibição da síntese de PGs renais e/ou devido à retenção de sódio e fluidos pelos AINE (LUZ, 2003).

O DCF está entre os princípios ativos mais usados entre os idosos (2,7%) (MOSEGUI et al., 1999). O uso concomitante de um AINE com ciclosporina em pacientes queimados e pós transplantes, sugere potencial interação nefrotóxica (ELDAD et al., 1994; TAMURA et al., 1990).

#### *1.1.3.1 Artrite reumatóide*

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva a deformidade e destruição das articulações em virtude de erosões ósseas e da cartilagem (LIPISK, 1998). É considerada uma das doenças autoimunes mais comuns, que afeta

aproximadamente 1% da população mundial (KVIEN et al., 2006; WILES et al., 1999).

As mulheres são duas a três vezes mais susceptíveis a essa doença do que homens e sua prevalência aumenta com a idade (BÉRTOLO et al., 2007). A idade de maior incidência é entre 30 e 60 anos, segundo Sweeney et al. (2004). Entretanto, Ito e Sato (2006) demonstraram, em camundongos, que uma vez instalada a AR, não existe diferença na gravidade da doença entre machos e fêmeas.

Em geral, a AR apresenta-se de uma forma simétrica e acomete grandes e pequenas articulações, tipicamente das mãos e pés, assim como punhos, ombros, cotovelos e tornozelos, em associação com manifestações sistêmicas como: rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Quando envolve outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em 5 a 10 anos (BÉRTOLO et al., 2007; WALSH et al., 2005).

Com a progressão da doença, os pacientes com AR desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades tanto da vida diária, como profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (BÉRTOLO et al., 2007). Após 3 anos da doença, 42% dos pacientes são considerados inaptos para o trabalho (ALBERS et al., 1999).

Os índices de morbidade e mortalidade desses pacientes se assemelham aos de pacientes portadores de doenças coronarianas ou com diabetes (SEYMOUR et al., 2001; VANDENBROUCKE et al., 1984).

O desencadeamento da AR está associada ao reconhecimento de antígenos por linfócitos TC4+ no tecido sinovial ou contato com agentes infecciosos, bem como exposição a outros agentes externos (DOAN & MASSAROTTI, 2005).

O início do processo inflamatório se manifesta por resposta nociceptiva e edematogênica na articulação. A ativação de células T e B leva à estimulação de monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais. Por consequência, observa-se aumento das citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas 1 e 6 e o fator

de necrose tumoral, das quimiocinas, auto-anticorpos, imunocomplexos e mediadores endógenos (SAKAGUCHI & SAKAGUCHI, 2005; SWEENEY et al., 2004).

A evolução do quadro de AR leva à proliferação das células sinoviais. Os mediadores inflamatórios liberados por essas células contribuem para a destruição do tecido ósseo e cartilaginoso, evoluindo para perda da função e deformidade das articulações (WALSH et al., 2005; HARRIS et al., 1990).

O tratamento da AR consiste no uso de agentes antiinflamatórios (os AINE e os AIE são os mais utilizados), drogas anti-reumáticas modificadoras de doenças (metotrexato, sulfasalazina, cloroquinas, ciclosporina) e os agentes anti-TNF e fatores recombinantes da IL-1 (LEONG, 2007; GAFFO et al., 2006; DOAN & MASSAROTTI, 2005). O uso dos AINE e AIE é restrito a períodos curtos devido aos efeitos adversos associados a esses fármacos (BENSEN et al., 1999).

Estados patológicos como a AR pode afetar a capacidade do fígado de metabolizar o DCF, possivelmente, devido aos efeitos de mediadores inflamatórios, absorção hepática de fármacos não ligados ou modulação dos processos intra-hepáticos (SANTOS, 2001).

#### *1.1.3.2 Osteoartrite*

A osteoartrite (OA) é uma doença articular crônica degenerativa que evidencia desgaste da cartilagem articular na qual, dentre as articulações de sustentação de peso, o joelho é o mais freqüentemente afetado. É a forma mais comum de doença articular no mundo ocidental e caracteriza-se por dor, rigidez matinal, crepitação óssea, atrofia muscular, estreitamento de espaço intra-articular, formações osteofíticas, esclerose do osso subcondral e formações císticas (ZACARON et al., 2006; MARX et al., 2006).

Um estudo da Organização Mundial da Saúde (OMS) refere que a OA seria a 4ª causa mais importante de incapacidade entre as mulheres e a 8ª entre os homens. Estudos radiográficos mostram algumas alterações em 30% de homens e mulheres

acima de 65 anos, mas apenas um terço destes são sintomáticos sendo que a prevalência da doença aumenta com a idade (MARX et al., 2006).

Embora a OA tenha sua patogênese pouco elucidada, alguns fatores de risco encontram-se bem estabelecidos. Entre esses fatores estão a obesidade, o envelhecimento, as lesões ou cirurgias prévias, o esforço ocupacional ou recreacional cumulativo, o mau alinhamento articular e fraqueza muscular (ZACARON et al., 2006).

Estima-se que 4% da população brasileira apresentam OA sendo, o joelho, a 2ª articulação mais acometida pela doença, com 37% dos casos (SENNA et al., 2004).

O tratamento da OA deve ser multidisciplinar. Medidas não-farmacológicas incluem programas educacionais, exercícios terapêuticos, órteses e equipamentos de auxílio à marcha. O tratamento farmacológico visa, fundamentalmente, a analgesia para melhorar a função e a qualidade de vida, além da modificação estrutural da cartilagem (PEREIRA et al., 2006; SANTOS, 2001).

Os AINE, por via oral, são largamente utilizados na OA sendo, o DCF, um dos que apresenta melhor resultado no tratamento. A aplicação tópica de AINE com alta penetração percutânea têm sido usada por décadas para aliviar a dor em tecidos musculoesqueléticos. Possivelmente, o uso tópico para o tratamento da OA reduz as reações adversas por maximizar o efeito local e minimizar a toxicidade sistêmica (PEREIRA et al., 2006).

#### *1.1.3.3 Gota aguda*

A hiperuricemia é um transtorno metabólico caracterizado pelo excesso de ácido úrico no sangue, produto de uma desordem no metabolismo das purinas. Os uratos, depositados em tofos nas pequenas articulações e nos tecidos, acabam por produzir um quadro denominado gota. É mais freqüente em homens do que em mulheres na proporção de 3:1. É incomum antes dos 30 anos de idade (JORDAN

et al., 2007; BECKER et al., 2005; SCHUMACKER et al., 2002; PEIXOTO et al., 2001).

As concentrações séricas de ácido úrico maiores que 7 mg/dL para os homens e maiores que 6 mg/dL para as mulheres são consideradas hiperuricemia (JORDAN et al., 2007; BECKER et al., 2005; SCHUMACKER et al., 2002).

A síndrome gotosa se manifesta nas formas clínicas de hiperuricemia assintomática, artrite gotosa aguda, períodos inter crises e artropatia gotosa crônica (JORDAN et al., 2007; BECKER et al., 2005; SCHUMACKER et al., 2002).

No tratamento farmacológico, o DCF é um dos medicamentos mais freqüentemente prescrito para a artrite gotosa aguda (BOSI et al., 1993).

#### *1.1.3.4 Artrite reumatóide juvenil*

Nas últimas décadas houve grande progresso no tratamento das artrites juvenis. O reconhecimento precoce de suas complicações, como a síndrome de ativação macrofágica, principalmente na forma sistêmica, resultou em declínio na mortalidade. A intervenção mais precoce nas formas poliarticulares também tem levado à evolução com menor incapacidade física e psicossocial (MACHADO & RUPERTO, 2005).

Os AINE ainda constituem a terapia de primeira linha para o tratamento da artrite reumatóide juvenil, cujo efeito deve ser observado por volta de um mês após seu início. Aproximadamente um terço dos pacientes pode ter a doença controlada com AINE aliados a programas adequados de fisioterapia e terapia ocupacional, enquanto os demais são candidatos a terapêuticas com drogas modificadoras de doença ou anti-reumáticas (MARTIN et al., 2006).

#### *1.1.3.5 Reumatismo não articular e lesões teciduais leves*

Segundo a OMS, a dor crônica afeta cerca de 30 % da população mundial e, entre as dores crônicas mais freqüentes, estão as dores osteoarticulares. Os segmentos

mais afetados por estas dores são a coluna cervical e lombar, os joelhos e os ombros (CARRERA et al., 2008).

A síndrome do impacto do ombro é uma síndrome dolorosa das mais freqüentes sendo somente suplantada, do ponto de vista epidemiológico, pelas cefaléias em geral e pelas dores lombares (CASTRO, 2009). Em todo o mundo, 60 a 80% das pessoas terão dor lombar durante a vida e 2 a 5% terão em qualquer tempo indeterminado. Nos Estados Unidos, a lombalgia é um dos problemas que mais levam as pessoas a procurarem um médico e é a causa mais comum de incapacidade abaixo dos 45 anos. A maioria dos pacientes melhora apenas com tratamento sintomático para dor. O tratamento medicamentoso de primeira linha consiste de analgésicos comuns e de AINE que incluem a aspirina e o DCF (GARCIA FILHO et al., 2006).

#### *1.1.3.6 Dismenorréia*

A dismenorréia está associada ao excesso da concentração de PGs no sangue, endométrio e fluxo menstrual. Assim, o tratamento com fármacos inibidores da síntese de PGs é eficaz no controle dos sinais e sintomas desta patologia (SANTOS, 2001).

A terapêutica sintomática da enxaqueca menstrual é similar à não menstrual, com a exceção de que os AINE têm, possivelmente, maior probabilidade de ser utilizados pelo reconhecimento do papel das PGs na sintomatologia associada a esta fase do ciclo (LODER, 2005).

Os AINE constituem uma alternativa para a profilaxia a curto prazo, particularmente, nas mulheres que referem crises associadas a menorragias (MACGREGOR, 2005). Esses fármacos inibem a liberação de PGs, cujo pico normalmente antecede o aparecimento da menstruação e é responsável por períodos dolorosos e abundantes. São usualmente recomendados em 1º lugar porque são eficazes, geralmente bem tolerados e têm preço razoável (SOUSA, 2008).

### *1.1.3.7 Outros estados dolorosos*

Estudos têm mostrado efetividade do DCF no tratamento da cólica renal, quando comparado a outros antiinflamatórios (COHEN et al., 1998; SUPERVÍA et al., 1998; LAERUM et al., 1996).

Ensaio clínicos têm utilizado o DCF como inibidor da síntese das PGs na analgesia antes de grandes cirurgias abdominais e torácicas (ROCKEMANN et al., 1996; PERTTUNEN et al., 1992). O DCF tem se mostrado superior aos outros AINE no controle da dor pós-operatória, não só porque sua potência analgésica é maior que seu efeito antiinflamatório, mas porque é menos tóxico para o trato gastrointestinal que drogas como cetoprofeno, piroxican e indometacina.

Segundo Arendt-Nielsen e Graven-Nielsen (2008), os antiinflamatórios atuam inibindo o componente inflamatório na musculatura e na articulação têmporo-mandibular reduzindo a liberação de substâncias inflamatórias, ativando ou sensibilizando os nociceptores periféricos e reduzindo a quantidade de impulsos nociceptivos aferentes. Estudos feitos por Varoli (2009) mostram a eficiência do DCF na inibição do componente inflamatório presente em muitas das formas de dores na musculatura mastigatória.

Em estudos realizados por Campebell et al. (2007), observou-se que o DCF sódico inibiu a síntese do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e atenuou os sintomas clínicos de hipertermia e hipomotilidade intestinal por reduzir a ativação da cascata inflamatória.

### *1.1.3.8 Efeitos tóxicos na mucosa gástrica e sistema renal*

Os AINE inibem a síntese de PGs, que são substâncias intermediárias no processo inflamatório, mediante a inativação das cicloxigenases (COX-1 e COX-2). A COX-1, responsável pela síntese das prostaglandinas e presente na maioria dos tecidos, está relacionada à função renal, à agregação plaquetária e à proteção da mucosa gástrica. Com isso, a inibição da COX-1 pelos AINE acarretaria os efeitos adversos

gastrintestinais e renais (BARBOSA et al., 2010; WANNMACHER, L. & BREDEMEIER,2004).

Os efeitos do DCF sobre o sistema gastrointestinal continuam sendo limitantes para sua prescrição como antiinflamatório, embora os AINE sejam uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo. Seus efeitos indesejáveis são mostrados em vários estudos relacionando o tratamento com DCF e os sintomas indesejáveis que vão desde os sintomas inespecíficos tais como náuseas, vômitos, eritema, diarreia, queimação e dor abdominal até o aparecimento de lesões gastrointestinais como sangramento, ulceração e, eventualmente, perfuração da parede gastrointestinal (MULLER et al., 2004).

Experimentos em animais demonstraram que as lesões gastrointestinais produzidas pela administração de AINE, são ocasionadas pelo contato direto de grandes concentrações do medicamento na mucosa gastrointestinal e por um mecanismo de ação sistêmica que aparece após a absorção (MULLER et al., 2004). A administração parenteral também pode causar lesão e sangramentos devido à inibição da biossíntese de PGs gástricas (LUZ, 2003).

As PGs renais vasodilatadoras são sintetizadas a partir da COX-1. A inibição da síntese das PGs que influenciam o fluxo sanguíneo cortical, a taxa de filtração glomerular e a excreção de água e eletrólitos poderá favorecer o aparecimento de uma isquemia e também de um dano renal. Os idosos, indivíduos com insuficiência cardíaca, doenças renais prévias, diabéticos, cirróticos e hipovolêmicos são pacientes nos quais o uso do AINE implica maior incidência e gravidade dos efeitos colaterais renais, por apresentarem uma maior dependência das PGs vasodilatadoras para o funcionamento dos rins (LUZ, 2003; KUMMER & COELHO, 2002).

## **1.2 Zinco**

O zinco é um oligoelemento, ou seja, é um elemento químico que, embora se apresente em quantidades pequenas no ser vivo, desempenha papel fisiológico

indispensável para o desenvolvimento da vida. No corpo humano é um importante gastroprotetor, representa apenas 0,003% (1,5 a 2,5g) e é considerado o 2º elemento-traço mais prevalente no organismo. Um adulto com peso de 70 kg possui cerca de 2 a 3 g do íon, que é primariamente intracelular: 80% concentram-se no citosol e o restante, no núcleo. As maiores concentrações corporais estão na musculatura esquelética (57%), ossos (29%), pele (5%), cérebro (1,5%), rins (0,7%), coração (0,4%), cabelo (0,1%) e plasma sanguíneo (0,1%) (PERSON et al., 2006; KING, 2000; TASMAN-JONES, 1992).

O entendimento das funções do zinco no metabolismo teve início em 1869 com Raulin, que descobriu sua essencialidade para a *Aspergillus niger*. Todd, Evehjem e Hart, em 1934, descobriram sua essencialidade para ratos e, mais tarde, em 1955, Tucker e Salmon descobriram problemas na pele do ser humano, decorrentes da deficiência de zinco. Em 1960, O'Dell observou que este mineral era essencial para crianças. Vários estudos se seguiram demonstrando que a deficiência de zinco era revertida pela suplementação (SANDSTEAD, 1994).

Embora em quantidade tão reduzida, esse oligoelemento é importante componente estabilizador de macromoléculas e membranas biológicas, sendo necessário em todas as fases da vida, em especial durante o desenvolvimento fetal e a gestação (TASMAN-JONES, 1992).

Diversas enzimas e proteínas contendo zinco participam do metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. Nas enzimas, o zinco pode ter função catalítica ou estrutural. Dentre as aproximadamente 300 enzimas nas quais o zinco exerce papel essencial na estrutura e função, estão a anidrase carbônica, que foi a primeira a ser descoberta, fosfatase alcalina, carboxipeptidases, álcool desidrogenase, superóxido dismutase, proteína C quinase, ácido ribonucleico polimerase e transcriptase reversa (PERSON et al., 2006; MAFRA & COZZOLINO, 2004).

Sua função engloba a regulação e inicialização da resposta imune, esteroidogênese, espermatogênese, metabolismo da vitamina A, metabolismo

energético, síntese protéica e divisão celular, além de apresentar importante função antioxidante (PERSON et al., 2006).

Cristais de zinco e insulina estão presentes nas células do pâncreas e há evidências que favorecem a hipótese de que o zinco é utilizado pelas células pancreáticas na estocagem e regulação da secreção de insulina (WAHID, 1988).

Uma importante função do zinco é a sua participação no sistema de defesa antioxidante. O íon inibe as reações de propagação de radicais livres devido à síntese de metalotioneínas (MT), proteínas citosólicas de baixo peso molecular (6.000 a 7.000 Da), que se ligam avidamente aos radicais promovendo proteção (*scavenger*) contra danos em membranas celulares. As MT também estão associadas à detoxificação de metais pesados no organismo (PERSON et al., 2006; SALGUEIRO et al., 2000).

O zinco é um elemento essencial para a função de linfócitos e fibroblastos, o que o torna fundamental na cicatrização e defesa imunológica humana (PERSON et al., 2006).

A quantidade de zinco no lúmen intestinal aumenta de 1 a 3 vezes devido à soma do zinco proveniente da dieta e daquele secretado nos sucos digestivos. Não obstante, os mecanismos de absorção e excreção deste oligoelemento obedecem a sistemas de auto-regulação com alta sensibilidade, o que faz com que os reajustes nos estoques dependam da necessidade e biodisponibilidade do íon no organismo. (PERSON et al., 2006; KREBS, 2000).

A deficiência de zinco, em humanos, foi primeiramente descrita por Prasad (1961) em uma população de Shiraz, Irã. Os homens iranianos afetados apresentavam anemia, hepatoesplenomegalia, hipogonadismo, nanismo e geofagia (PERSON et al., 2006).

A deficiência de zinco é considerada um problema mundial e tem sido cada vez mais detectada, principalmente, nos países em desenvolvimento, onde estudos bem delineados têm mostrado a importância clínica deste estado de deficiência,

onde se observa: retardo no crescimento, diarreia, pneumonia e desenvolvimento cerebral prejudicado. A deficiência relativa de zinco deve ser considerada em situações de crescimento rápido, nas quais há aumento da demanda do oligoelemento, como na infância, puberdade, gravidez e lactação (HAMBIDGE, 2000; SHUTTLEWORTH, 1986).

Mafrá & Cozzolino (2004) pesquisando a deficiência de zinco na insuficiência renal crônica, observaram reduzida concentração de zinco no plasma dos pacientes urêmicos e uma concentração eritrocitária de zinco elevada, sugerindo distribuição anormal deste oligoelemento e não deficiência verdadeira.

A deficiência do zinco tem sido considerada como um fator importante na malformação congênita e defeitos de formação do tubo neural (PERSON et al., 2006).

A interação entre o zinco e taurina pode ser crucial para o desenvolvimento de estruturas nobres do cérebro, como o hipocampo (PERSON et al., 2006).

As alterações na homeostase do zinco podem contribuir para algumas condições degenerativas, incluindo a doença de Alzheimer. Em situações de injúria, o acúmulo de zinco nas sinapses e em neurônios pós-sinápticos contribui para uma perda neuronal seletiva, que ocorre em certas condições agudas, como a epilepsia e a isquemia global transiente (PERSON et al., 2006; WEISS et al., 2001).

O zinco induz monócitos a produzirem interleucina-1, interleucina-6 e inibir a produção de fator de necrose tumoral, que está implicado na fisiopatologia da caquexia na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (BAUM et al., 2000).

Diante de tantas funções atribuídas ao zinco e considerando que sua fisiologia no organismo humano começou a ser desvendada somente no último século, é bastante provável que esse íon exerça funções ainda desconhecidas dos pesquisadores (PERSON et al., 2006).

### **1.3 Diclofenaco-Zinco**

Santos (2001), realizando testes para verificar a eficácia farmacológica do diclofenaco-zinco (DCF Zn), induziu o processo inflamatório do edema de pata pela carragenina. Observou-se que a administração do DCF, do DCF Zn e da co-administração de DCF mais acetato de zinco inibiu a formação do edema induzido pela carragenina. Assim, na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> h após a administração da carragenina, os grupos tratados com os referidos fármacos apresentaram edema menor quando comparados com o grupo controle. Entretanto, observou-se que no grupo tratado com o DCF Zn, na 4<sup>a</sup> h após a administração da carragenina, o complexo apresentou atividade significativamente menor que o DCF livre.

No granuloma foi avaliada a atividade antiinflamatória dos fármacos sobre a fase proliferativa da resposta inflamatória em ratos. Com isso, observou-se que a administração diária de DCF, DCF Zn e DCF mais acetato de zinco foi capaz de inibir o aumento do granuloma, apresentando diferença significativa em relação ao controle, além de não se observar diferença estatisticamente significativa entre os tratados com as diferentes formulações (SANTOS, 2001; ABOU-MOHAMED et al., 1995). Nesse estudo, foi utilizado, também, o modelo de Hargreaves para avaliar a atividade antinociceptiva do complexo DCF Zn. O modelo de Hargreaves utiliza estímulo térmico para nocicepção como fator positivo, a diminuição do estresse dos animais, visto que as avaliações são executadas sem que o animal seja manipulado ou contido durante a leitura (HARGREAVES, 1988). Tanto o DCF, quanto o DCF Zn ou a associação DCF mais acetato de zinco foram capazes de inibir a resposta nociceptiva, neste modelo, na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> h após a administração da carragenina.

Com relação à atividade ulcerogênica do DCF Zn, em ratos, a incidência de lesões gástricas do complexo foi comparada com a do fármaco livre e com a incidência quando da associação DCF mais acetato de zinco. Quando os fármacos foram administrados por via oral, foi observado nos três níveis de lesão, menor índice no grupo tratado com o complexo, quando comparado com o tratado com o fármaco livre. A associação DCF mais acetato de zinco apresentou incidência de lesões

estatisticamente igual ao do fármaco livre, justificando a complexação do DCF diclofenaco com o zinco. Quando os animais receberam os fármacos por via intraperitoneal, apresentaram um perfil gastrotóxico similar ao do complexo, sendo estatisticamente menor que o DCF nos três níveis de lesão (SANTOS, 2001).

Em função dos resultados obtidos no referido estudo, além do ineditismo desse complexo, foi depositado um processo de pedido de patente pela CTIT da UFMG junto ao INPI sob o nº PI0208523-2.

#### **1.4 Efeitos renais dos antiinflamatórios**

Os AINE podem induzir injúria renal aguda (IRA) de duas diferentes maneiras: hemodinamicamente mediada por nefrite intersticial, freqüentemente acompanhada de síndrome nefrótica (ROSE, 2007). Esses efeitos estão diretamente relacionados à redução da síntese de PGs induzida pelos AINE, o que influencia o fluxo sanguíneo cortical, a taxa de filtração glomerular e a excreção de água e eletrólitos (ROSE, 2007; LUZ, 2003). A inibição de PGs na presença de AINE pode causar isquemia e dano renal, sob condições de diminuição do volume efetivo circulante (LUZ, 2003; KUMMER & COELHO, 2002).

Sugere-se que a incidência global de nefrotoxicidade associada ao AINE é pequena e o risco de disfunção renal tem sido motivo de controvérsia (LUZ, 2003). Idosos, pacientes com insuficiência cardíaca, doenças renais prévias, diabéticos, cirróticos, hipovolêmicos são pacientes nos quais o uso de AINE implica em maior incidência e gravidade dos efeitos colaterais renais por encontrarem-se em maior dependência das PGs renais vasodilatadoras para o adequado funcionamento desse órgão (KUMMER & COELHO, 2002).

O fato do avanço da idade estar associado com o declínio progressivo da função renal gera sérias implicações para a segurança no uso de antiinflamatórios em pacientes idosos. Já em adultos jovens, sem história prévia de alterações renais, os AINE não parecem interferir na função deste órgão podendo ser indicados sempre que necessário (KUMMER & COELHO, 2002; WHELTON, 2001).

Os AINE convencionais podem ocasionar edema e retenção de sal, os quais estão entre os mais comuns efeitos adversos AINE-associados envolvendo o rim (KUMMER & COELHO, 2002; WHELTON, 2001).

Os AINE podem ainda interferir na hemostasia causando edema, hipercalemia e comprometimento do efeito natriurético dos diuréticos (LUZ, 2003).

Apesar do risco de toxicidade renal associada com o uso de AINE convencionais ser relativamente baixa, cerca de 5% dos pacientes em uso de tais agentes podem desenvolver uma ou mais das complicações renais descritas previamente. Tal estimativa pode aumentar principalmente diante de fatores de risco (KUMMER & COELHO, 2002; WHELTON, 2001) como as doenças anteriormente citadas.

No entanto, Lee (2007) relatou que a redução da função renal causada pelo DCF é transitória em pacientes que apresentavam função renal normal no período pré-operatório e que, então, este fato não deveria representar impedimento para o uso de tal medicamento.

No presente estudo, como forma de continuidade dos estudos envolvendo o complexo DCF Zn, foi investigado um possível efeito desse complexo sobre a função renal de ratos com injúria renal aguda induzida pelo antibiótico gentamicina (GM).

Cabe ressaltar que foi realizado o depósito da patente do complexo diclofenaco-zinco (DCF Zn) pela CTIT/UFMG (nº PI0208523-2) junto ao INPI.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do composto DCF Zn (CTIT/UFMG/INPI/PI0208523-2) sobre a função renal de ratos com necrose tubular aguda (NTA) induzida por gentamicina.

### **2.2 Objetivos específicos**

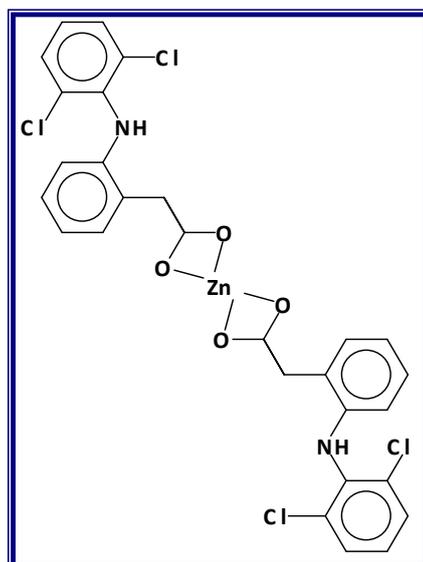
Comparar o efeito do tratamento com DCF livre, DCF associado ao acetato de Zinco e do complexo DCF Zn sobre parâmetros de função renal (filtração glomerular, reabsorção de água e eletrólitos, entre outros) em ratos com disfunção renal induzida pela gentamicina.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Fármacos

- Diclofenaco de sódio (Galena Química Farmacêutica) Lote: GAL071013-5
- Diclofenaco-zinco – foi sintetizado pelo Prof. Ricardo José Alves do Lab. de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. A análise elementar do complexo foi feita pela “Central Analítica do Instituto de Química da USP”
- Acetato de zinco (Sigma)
- Carboximetilcelulose - sal sódico (Synth®) Lote: 119902
- Solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%
- Sulfato de Gentamicina 4% (Gentomicin® - Syntec)
- Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin® - Syntec)
- Cloridrato de Cetamina 10% (Ketamin® - Syntec)

#### Complexo Diclofenaco-Zinco (DCF Zn)



Formula Molecular:  $C_{28}H_{20}Cl_4N_2O_4Zn$

Peso Molecular: 655,65

### **3.2 Equipamentos**

- Balança analítica (Sartorius® – TE214S)
- Gaiolas metabólicas
- Analisador automático VITROS® 250/350, 950 (*Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson*)

### **3.3 Animais**

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, pesando entre 250 e 300 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Desde o nascimento, os animais foram mantidos sob um ciclo de claridade - escuridão sendo, 14 h de claridade e 10 h de escuridão, recebendo água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 177/2008).

### **3.4 Protocolos experimentais**

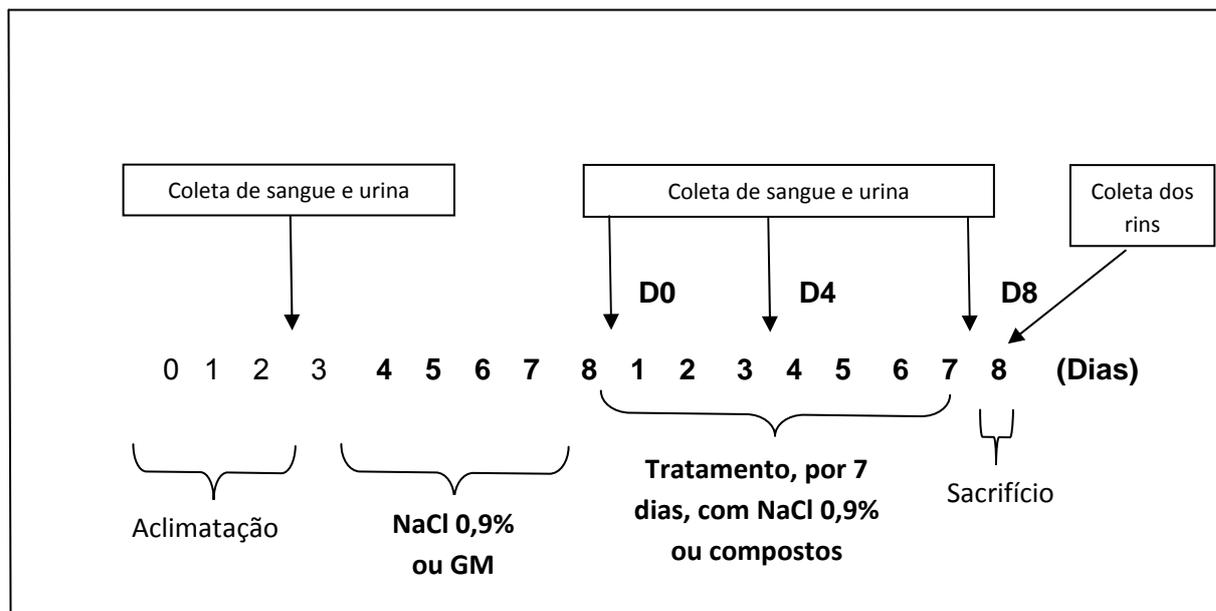
O estudo envolveu a formação de 7 grupos experimentais contendo, no início, 6 ratos/grupo. Nestes grupos, foi avaliado o grau de nefrotoxicidade do DCF livre, DCF associado ao acetato de zinco (AcZn) e do complexo diclofenaco-zinco (DCF Zn). Para isto, foi utilizado um modelo de injúria renal aguda, induzida pelo antibiótico gentamicina (GM). A dose diária de GM foi de 80 mg/kg dividida em 2 doses de 40 mg/kg (via intraperitoneal, 2 vezes/dia, por 5 dias). Ao término da indução de IRA, os compostos a serem estudados foram administrados, diariamente (1 vez/dia), por 7 dias, de acordo com os grupos experimentais correspondentes.

Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas durante 3 dias para aclimatação e, em seguida, foram tratados com GM (40 mg/kg/dia, 2 vezes/dia, 0,1 ml/100g de peso corporal da solução 40 mg/ml), por 5 dias. Os animais receberam GM (40 mg/kg), subcutaneamente (s.c.), 2 vezes ao dia (às 9h e às 17h) sendo que no primeiro dia foi aplicada dose única (dose de ataque, 80 mg/kg). Os ratos do grupo **1** foram submetidos ao mesmo procedimento recebendo, no entanto, injeção de NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal).

Durante os períodos de aclimatação, de indução da IRA (5 dias) e de tratamento (7 dias), o volume de urina, a ingestão de água e o peso dos animais foram medidos diariamente. Para análises posteriores, uma alíquota de urina (1 ml) foi coletada em tubos de microcentrífuga (tipo *ependorf*) e armazenada a -20 °C. No fim da aclimatação (3 dias), deu-se início à administração de GM nos ratos dos grupos **2 a 7**, por 5 dias (dia zero, **D0**). Em seguida, iniciou-se o tratamento, por 7 dias, com DCF, DCF mais concentrações crescentes de AcZn ou com o complexo DCF Zn.

No dia zero (**D0**, fim da administração de GM ou NaCl 0,9% no grupo **1** e início do tratamento com os compostos), dia 4 (**D4**, quarto dia pós-início do tratamento com os compostos) e dia 8 (**D8**, um dia após o término do tratamento que durou 7 dias), aproximadamente, 1 ml de sangue foi coletado de uma veia da cauda para posteriores determinações laboratoriais. Nestes mesmos dias, amostras de urina também foram coletadas para análises laboratoriais similares às realizadas no sangue.

Para a obtenção do plasma, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm, por 10 min, à temperatura ambiente. As amostras de urina e plasma foram armazenadas a -20°C até o momento das dosagens laboratoriais. O quadro a seguir, sumariza o protocolo experimental utilizado.



Para analisar as alterações morfológicas decorrentes da IRA e dos possíveis efeitos do tratamento, ao término do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, intra-peritoneal) e colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa. Uma incisão longitudinal no abdome foi realizada e as vísceras abdominais foram deslocadas de modo que o rim direito ficasse exposto. Com auxílio de uma tesoura, os rins direito e esquerdo foram removidos e decapsulados. Os rins direito e esquerdo foram colocados em solução de formol tamponado a 10% sendo, em seguida, encaminhados para o Laboratório de Patologia Comparada - ICB/UFMG, onde foram submetidos às técnicas convencionais de coloração (eosina-hematoxilina) para análises histológicas dos mesmos.

### **3.5 Grupos experimentais**

A Tabela 1 sumariza os procedimentos durante o período de indução da IRA com GM e o tratamento posterior com DCF livre, DCF associado ao AcZn e o complexo DCF Zn.

**Tabela 1.** Sumário dos grupos experimentais utilizados no estudo.

<b>Grupos</b>	<b>Procedimento durante a indução da IRA</b>	<b>Procedimento durante o tratamento</b>
1 (SAL-CMC)	NaCl 0,9%	CMC (0,5 ml/100g)
2 (GM-CMC)	GM (80 mg/kg/dia)	CMC (0,5 ml/100g)
3 (GM-DCF)	GM (80 mg/kg/dia)	DCF (10mg/kg) em CMC (0,5 ml/100 g)
4 (GM-DCF+AcZn3,35)	GM (80 mg/kg/dia)	DCF (10mg/kg) + AcZn (3,35mg/kg) em CMC (0,5 ml/100ml)
5 (GM-DCF+AcZn6,7)	GM (80 mg/kg/dia)	DCF (10mg/kg) + AcZn (6,7mg/kg) em CMC (0,5 ml/100ml)
6 (GM-DCF+AcZn13,4)	GM (80 mg/kg/dia)	DCF 10mg/kg) + AcZn (13,4mg/kg) em CMC (0,5 ml/100ml)
7 (GM-DCF Zn)	GM (80 mg/kg/dia)	DCF Zn (11 mg/kg) em CMC (0,5 ml/100ml)

### 3.5.1 Detalhamento dos grupos experimentais

**Grupo 1** (controle): os ratos foram injetados, intraperitonealmente, com NaCl 0,9% (0,1 ml/100g de peso corporal), 2 vezes/dia, por 5 dias. Em seguida, receberam, via oral (gavagem), 0,5 ml de suspensão de carboximetilcelulose (CMC) a 0,5% para cada 100 g de peso do animal, 1 vez/dia, por 7 dias.

**Grupo 2:** os ratos foram injetados, intraperitonealmente, com GM (40 mg/kg/dia, 0,1ml/100g de peso corporal), 2 vezes/dia, por 5 dias sendo, o 1º dia, dose única (dose de ataque). Em seguida, receberam, via oral (gavagem), 0,5 ml de suspensão de CMC a 0,5% para cada 100 g de peso do animal, 1 vez/dia, por 7 dias.

**Grupo 3:** os ratos foram injetados, intraperitonealmente, com GM (40 mg/kg/dia, 0,1ml/100g de peso corporal), 2 vezes/dia, por 5 dias sendo, o 1º dia, dose única (dose de ataque). Em seguida, receberam via oral (gavagem), DCF de sódio (10 mg/kg) em 0,5 ml de suspensão de CMC a 0,5% para cada 100 g de peso do animal, 1 vez/dia, por 7 dias.

**Grupo 4:** os ratos foram injetados, intraperitonealmente, com GM (40 mg/kg/dia, 0,1ml/100g de peso corporal), 2 vezes/dia, por 5 dias sendo, o 1º dia, dose única

(dose de ataque). Em seguida, receberam via oral (gavagem), DCF de sódio (10 mg/kg) mais AcZn (3,35 mg/kg) em 0,5 ml de suspensão de CMC a 0,5% para cada 100 g de peso do animal, 1 vez/dia, por 7 dias.

**Grupo 5:** os ratos foram injetados, intraperitonealmente, com GM (40 mg/kg/dia, 0,1ml/100g de peso corporal), 2 vezes/dia, por 5 dias sendo, o 1º dia, dose única (dose de ataque). Em seguida, receberam via oral (gavagem), DCF de sódio (10 mg/kg) mais AcZn (6,7 mg/kg) em 0,5 ml de suspensão de CMC a 0,5% para cada 100 g de peso do animal, 1 vez/dia, por 7 dias.

**Grupo 6:** os ratos foram injetados, intraperitonealmente, com GM (40 mg/kg/dia, 0,1ml/100g de peso corporal), 2 vezes/dia, por 5 dias sendo, o 1º dia, dose única (dose de ataque). Em seguida, receberam via oral (gavagem), DCF de sódio (10 mg/kg) mais AcZn (13,4 mg/kg) em 0,5 ml de suspensão de CMC a 0,5% para cada 100 g de peso do animal, 1 vez/dia, por 7 dias.

**Grupo 7:** os ratos foram injetados, intraperitonealmente, com GM (40 mg/kg/dia, 0,1ml/100g de peso corporal), 2 vezes/dia, por 5 dias sendo, o 1º dia, dose única (dose de ataque). Em seguida, receberam via oral (gavagem), de **DCF Zn** (11 mg/kg) em 0,5 ml de suspensão de CMC a 0,5% para cada 100 g de peso do animal, 1 vez/dia, por 7 dias.

### **3.6 Procedimentos analíticos para avaliação da função renal**

Os procedimentos analíticos foram executados através de ensaios MicroSlide™ VITROS® da *Ortho Clinical Diagnostics* da *Johnson & Johnson*, nos Sistemas Químicos VITROS 250/350, 950 e de acordo com as instruções do fabricante.

As seguintes dosagens foram feitas no plasma: glicose, uréia, creatinina, sódio e potássio. E na urina foram dosados: glicose, uréia, creatinina, sódio, potássio e enzima gama glutamil transferase (gama GT).

A Tabela 2 sumariza as dosagens laboratoriais e os tipos de reações envolvidas nas mesmas.

**Tabela 2.** Sumário dos testes bioquímicos utilizados no experimento

<b>Testes</b>	<b>Tipo de reação</b>
Glicose	colorimétrico
Uréia	colorimétrico
Creatinina	enzimático de 2 pontos
Sódio	potenciométrico
Potássio	potenciométrico
Gama GT	cinético de pontos múltiplos
Microalbuminúria	colorimétrico

### 3.6.1 Osmolalidade

A osmolalidade sanguínea (Osm) e urinária foram calculadas utilizando-se a fórmula abaixo, de acordo com instruções da *Ortho Clinical Diagnostics* da *Johnson & Johnson company*.

Fórmula:

$$\text{Osm} = ([\text{Na}^+] \times 1,86) + ([\text{glicose}]/18) + \text{BUN}/2,8$$

O Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{RFG (ml/min)} = ([\text{Creatinina}]_{\text{urina}} \times \text{Fluxo urinário}) / [\text{Creatinina}]_{\text{plasma}}$$

Conhecendo-se as concentrações plasmáticas e urinárias de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , alguns parâmetros puderam ser quantitativamente avaliados, conforme as equações:

$$QF = [Na^+ \text{ ou } K^+]_{\text{plasma}} \times RFG$$

$$QE = [Na^+ \text{ ou } K^+]_{\text{urina}} \times FU$$

$$FE_{Na^+} (\%) = QE_{Na^+} / QF_{Na^+} \times 100$$

$$FE_{K^+} (\%) = QE_{K^+} / QF_{K^+} \times 100$$

$$FE_{H_2O} (\%) = FU / RFG \times 100$$

- [ ], concentração;
- RFG, ritmo de filtração glomerular;
- FU, fluxo urinário;
- QF, quantidade filtrada;
- QE, quantidade excretada;
- FE, fração de excreção.

### 3.7 Análise morfológica renal

Rins direitos dos ratos (3) de cada grupo foram sorteados ao acaso para a análise histológica. Técnicas convencionais de coloração (Hematoxilina-eosina) foram usadas na preparação das lâminas. O corte dos blocos foram não seriados com a intenção de visualização de diferentes néfrons.

### 3.8 Análise estatística

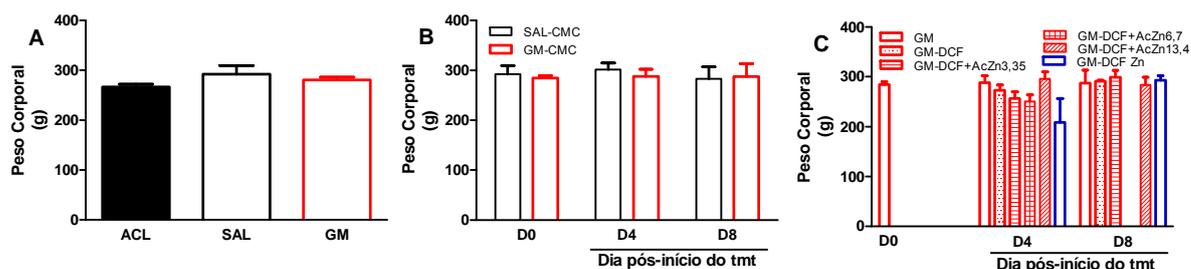
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $X \pm EPM$ ). De acordo com a adequação, os dados foram analisados por *One-way* ANOVA (seguida de teste de Newman-Keuls) e *Two-way* ANOVA (seguida de teste de Bonferroni). Quando conveniente, o teste “t” para amostras não pareadas também foi utilizado.

## 4 RESULTADOS

Neste trabalho foi investigado um possível efeito do composto DCF Zn sobre diversos parâmetros de função renal em ratos com necrose tubular aguda (NTA) induzida pela GM. Em tal estudo, esse possível efeito foi comparado ao efeito do DCF livre e do DCF livre associado ao acetato de zinco em 3 concentrações distintas. O estudo foi composto por 7 grupos experimentais, sendo que apenas um grupo (grupo I, controle) foi constituído por animais normais e tratados apenas com CMC, o veículo utilizado para o preparo das substâncias aqui testadas. Inicialmente, é importante ressaltar que a CMC não promoveu qualquer alteração em nenhum dos parâmetros analisados tanto nos animais do grupo controle, quanto naqueles do grupo com NTA induzida pela GM. Os 6 grupos restantes foram compostos por ratos com NTA induzida por GM e posteriormente tratados, por 7 dias com as substâncias e associações já citadas acima. A avaliação das possíveis alterações provocadas pelo tratamento que teve duração de 7 dias, foi feita no 4º (D4) e 8º dias (D8) significando, neste último, que a avaliação foi realizada no dia seguinte ao término do tratamento.

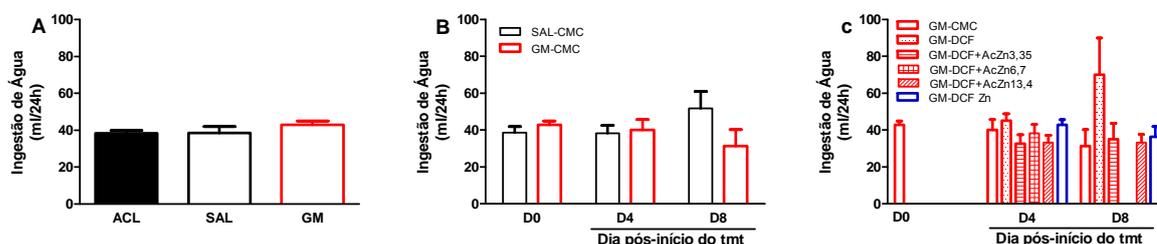
### 4.1 Aspectos Gerais

A Figura 1A mostra que o processo de indução de NTA com GM, por si só, não afetou o peso corporal dos animais e a administração de CMC não modificou esse parâmetro nem no grupo controle, nem no grupo com NTA (Fig. 1B). Também, o tratamento, avaliado no 4º e 8º dias após o início do tratamento, com DCF livre e com DCF associado a 3 doses de acetato de zinco não produziu qualquer efeito sobre o peso corporal de ratos com injúria renal induzida pela GM. Igualmente, o composto DCF Zn não apresentou nenhuma alteração detectável no peso corporal, quer seja quando comparado aos animais que receberam apenas GM, quer seja quando comparado com os ratos com NTA induzida por GM e tratados com DCF livre ou DCF associado ao acetato de zinco (Fig. 1C).



**Figura 1.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre o peso corporal de ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias,  $n = 36$ ) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle,  $n = 6$ ); ACL, aclimatação ( $n = 42$ ). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre o peso corporal de ratos normais (SAL-CMC,  $n = 6$ ) e ratos com NTA (GM-CMC,  $n = 6$ ). O peso corporal foi avaliado no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre o peso corporal de ratos com NTA mais DCF livre (10 mg/kg,  $n = 3-6$ ), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg,  $n = 3-6$ , 6,7 mg/kg,  $n = 6$  e 13,4 mg/kg,  $n = 3-6$ ) e DCF Zn (11 mg/kg,  $n = 4-7$ ). O peso corporal foi avaliado nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose.

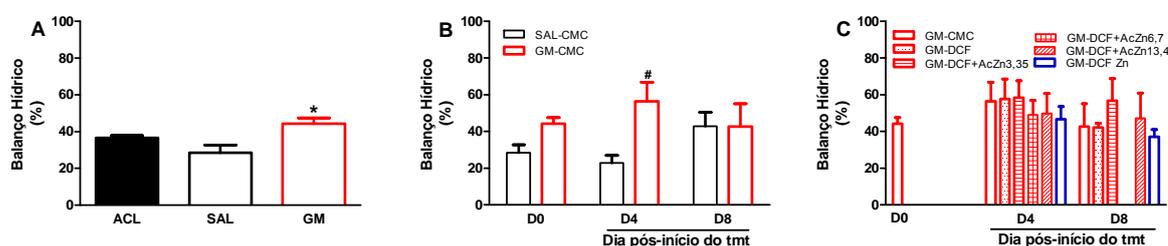
Similarmente ao observado para o peso corporal, a ingestão de água também não foi afetada em nenhum grupo experimental sob estudo (Fig. 2A a 2C).



**Figura 2.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre a ingestão de água por ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias,  $n = 33$ ) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle,  $n = 6$ ); ACL, aclimatação ( $n = 42$ ). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre a ingestão de água por ratos normais (SAL-CMC,  $n = 6$ ) e ratos com NTA

(GM-CMC, n = 4-33). A ingestão de água foi avaliada no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C** comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre a ingestão de água por ratos com NTA mais DCF livre (10 mg/kg, n = 3-6), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 3-6, 6,7 mg/kg, n = 6 e 13,4 mg/kg, n = 3-6) e DCF Zn (11 mg/kg, n = 4-6). A ingestão de água foi avaliada nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose.

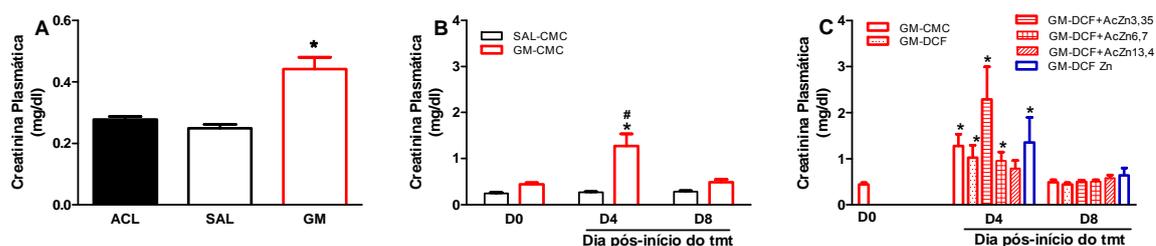
Quando o balanço hídrico (FU/água ingerida x 100) (Fig. 3A) foi analisado, observou-se que a GM, por si só, causou aumento do mesmo em comparação aos animais durante a aclimatação ou aos animais que receberam apenas salina (grupo controle). Na Fig. 3B pode-se observar que o balanço hídrico no grupo com NTA e que recebeu CMC, por 4 dias (D4) foi estatisticamente diferente do grupo controle que também recebeu CMC. Nenhuma alteração significativa foi observada nos demais grupos experimentais (Fig. 3C).



**Figura 3.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre o balanço hídrico em ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias, n = 33) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle, n = 6); ACL, aclimatação (n= 42). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre o balanço hídrico em ratos normais (SAL-CMC, n = 3-6) e ratos com NTA (GM-CMC, n = 4-33). O balanço hídrico foi avaliado no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre o balanço hídrico em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg, n = 3-6), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 3-6, 6,7 mg/kg, n = 6 e 13,4 mg/kg, n = 3-6) e DCF Zn (11 mg/kg, n = 4-6). O balanço foi avaliado nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \*p < 0,05 vs ACL ou SAL; #p < 0,05 vs SAL no mesmo dia de tratamento (D4).

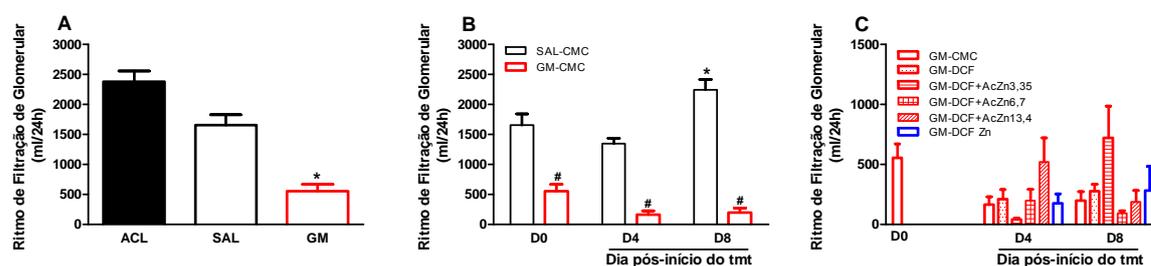
## 4.2 Avaliação da função renal

A Figura 4 mostra que a GM, por si só, aumentou a concentração plasmática de creatinina (Fig. 4A), o qual persistiu até o 4º dia de tratamento com CMC (4 dias após a interrupção da administração de GM) (Fig. 4B). Nos grupos tratados com DCF livre, com DCF associado a 3 doses de acetato de zinco e no grupo tratado com o composto DCF Zn, a creatinina plasmática apresentou-se elevada no 4º dia de tratamento (D4) com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 4C). No entanto, a creatinina não foi estatisticamente diferente quando os grupos foram comparados no mesmo dia de tratamento (Fig. 4C, D4). Após o término do tratamento (D8), a creatinina plasmática retornou a valores similares aos observados no D0 (Fig. 4C, D8).



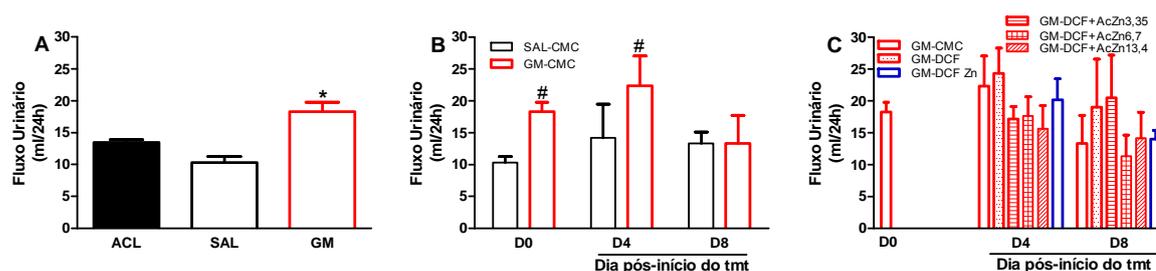
**Figura 4.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre a creatinina plasmática em ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias, n = 36) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle, n = 6); ACL, aclimatação (n= 42). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre a creatinina plasmática em ratos normais (SAL-CMC, n = 6) e ratos com NTA (GM-CMC, n = 5-36). A creatinina plasmática foi avaliada no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre a creatinina plasmática em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg, n = 3-6), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 3-6, 6,7 mg/kg, n = 4-6 e 13,4 mg/kg, n = 6) e DCF Zn (11 mg/kg, n = 5-6). A creatinina foi avaliada nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \*p < 0,05 vs ACL ou SAL (A) e vs D0 (B); #p < 0,05 vs SAL no mesmo dia de tratamento (B, D4).

Conforme pode ser observado pela Figura 5, a GM, por si só, reduziu o ritmo de filtração glomerular (RFG) tanto quando comparado ao período de aclimação, como ao grupo controle Fig. 5A). A queda no RFG foi persistente podendo ser observada no 4º (D4) e 8º (D8) dias pós-início do tratamento com CMC, veículo utilizado para o preparo dos composto testados (Fig. 5B). Nos grupos tratados com DCF livre e com DCF associado a 3 doses de acetato de zinco, embora tenha havido, em alguns grupos, tendência de queda do RFG no 4º (D4) e 8º dias (D8) de tratamento com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 5C), a mesma não alcançou significância estatística. O RFG também não foi estatisticamente diferente quando os grupos foram comparados no mesmo dia de tratamento (D4 ou D8, Fig. 5C). Perfil semelhante foi observado no grupo tratado com o composto DCF Zn no 4º (D4) e 8º (D8) dias pós-início de tratamento com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 5C).

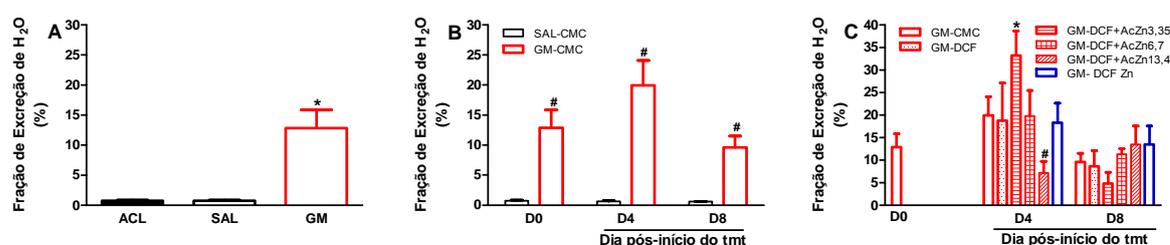


**Figura 5.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre o RFG em ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias, n = 36) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle, n = 5); ACL, aclimação (n= 42). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre o RFG em ratos normais (SAL-CMC, n = 3-5) e ratos com NTA (GM-CMC, n = 6-36). O RFG foi avaliado no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre o RFG em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg, n = 3-4), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 3-5, 6,7 mg/kg, n = 3-6 e 13,4 mg/kg, n = 4-6) e o complexo DCF Zn (11 mg/kg, n = 4-6). O RFG foi avaliado nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \*p < 0,05 vs ACL ou SAL (A) e vs D0 (B); #p < 0,05 vs SAL no mesmo dia de tratamento (B, D0, D4 e D8).

A GM, por si só, aumentou o fluxo urinário (FU) tanto quando comparado ao período de aclimatação, como ao grupo controle Fig. 6A). O aumento no FU persistiu e pôde ainda ser observado no 4º (D4) dia após o início do tratamento com CMC (Fig. 6B). Nos grupos tratados com DCF livre e com DCF associado a 3 doses de acetato de zinco, nenhuma alteração significativa foi detectada nem no 4º (D4), nem no 8º dias (D8) pós-início do tratamento com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 6C). O FU também não foi estatisticamente diferente quando os grupos foram comparados dentro do mesmo dia após o início do tratamento (D4 ou D8, Fig. 6C). Perfil semelhante foi observado no grupo tratado com o complexo DCF Zn no 4º (D4) e 8º (D8) dias após o início de tratamento com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 6C) ou dentro do mesmo dia pós-início do tratamento (D4 ou D8, Fig. 6C).



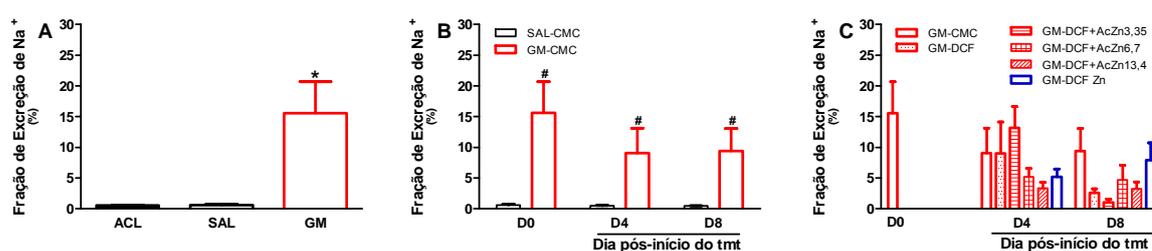
A Figura 7 mostra que a GM, por si só, aumentou a fração de excreção de água (Fig. 7A), tanto em comparação com a fração no período de aclimatação, como com o grupo controle (SAL). Essa fração aumentada ainda persistia no 4º (D4) e 8º (D8) dias após o início do tratamento com CMC (4 dias após a interrupção da administração de GM) (Fig. 7B). Nos grupos tratados com DCF livre e com DCF associado a 3 doses de acetato de zinco, a fração de excreção de água apresentou-se modificada, de forma distinta, em alguns desses grupos. Por exemplo, no grupo GM-DCF + AcZn 3,35, a fração estava elevada, no 4º dia após o início do tratamento (D4) em relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 7C), enquanto que a mesma encontrava-se diminuída no grupo GM-DCF + AcZn 13,7 em comparação ao grupo GM-CMC, no mesmo tempo (D4). Após o término do tratamento (D8), a fração de excreção de água retornou a valores similares aos observados no D0 (Fig. 7C, D8). O tratamento com o complexo DCF Zn (grupo GM-DCF Zn), no 4º (D4) e 8º dias do tratamento (D8) não afetou significativamente a excreção de água com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 7C), nem quando os grupos foram comparados nos mesmos dias de tratamento (D4 e D8, Fig. 7C).



**Figura 7.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre a fração de excreção de água em ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias, n = 36) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle, n = 6); ACL, aclimatação (n = 42). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre a fração de excreção de água em ratos normais (SAL-CMC, n = 3-5) e ratos com NTA (GM-CMC, n = 6-36). A fração de excreção de água foi avaliada no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre a fração de excreção de água em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg, n = 3-4), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 3-4, 6,7 mg/kg, n = 3-6 e 13,4 mg/kg, n = 4-5) e o

complexo DCF Zn (11 mg/kg, n = 4-6). A fração de excreção de água foi avaliada nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \*p <0,05 vs ACL ou SAL (A); #p < 0,05 vs SAL no mesmo dia de tratamento (B, D0, D4 e D8).

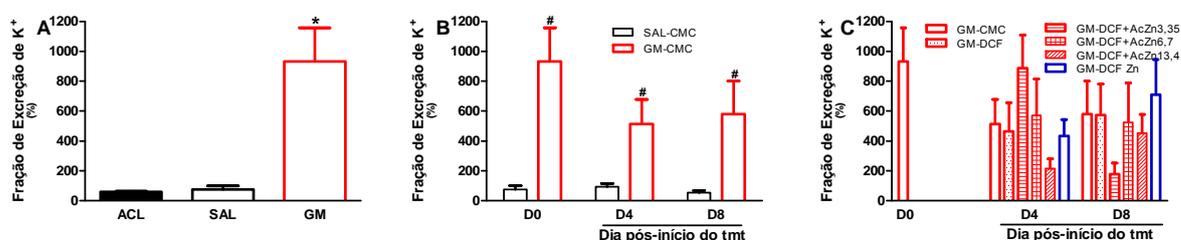
Conforme pode ser observado pela Figura 8, a GM, por si só, aumentou a fração de excreção de Na<sup>+</sup> (Fig. 8A), tanto em comparação com a fração no período de aclimatação, como com a fração no grupo controle (SAL). Esta fração aumentada ainda persistia no 4<sup>o</sup> (D4) e 8<sup>o</sup> (D8) dias após o início do tratamento com CMC (4 dias após a interrupção da administração de GM) (Fig. 8B). Nos grupos tratados com DCF livre e com DCF associado a 3 doses de acetato de zinco, embora tenha havido, em alguns grupos, tendência de queda da fração de excreção de Na<sup>+</sup> no 4<sup>o</sup> (D4) e 8<sup>o</sup> dias (D8) de tratamento com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 8C), a mesma não alcançou significância estatística. A fração de excreção de Na<sup>+</sup> também não foi estatisticamente diferente quando os grupos foram comparados no mesmo dia de tratamento (D4 ou D8, Fig. 8C). Perfil semelhante foi observado no grupo tratado com o complexo DCF Zn no 4<sup>o</sup> (D4) e 8<sup>o</sup> (D8) dias após o início de tratamento com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 8C). Também não foi observada nenhuma diferença quando os grupos foram comparados no mesmo dia de tratamento (D4 ou D8, Fig. 8C).



**Figura 8.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre a fração de excreção de Na<sup>+</sup> em ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias, n = 24) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle, n = 5); ACL, aclimatação (n = 42). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre a fração de excreção de Na<sup>+</sup> em ratos normais (SAL-CMC, n = 3-6) e ratos com NTA (GM-CMC, n = 3-24). A fração de excreção de Na<sup>+</sup> foi avaliada no 4<sup>o</sup> dia

de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre a fração de excreção de  $\text{Na}^+$  em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg, n = 3), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 3-5, 6,7 mg/kg, n = 3-5 e 13,4 mg/kg, n = 4) e o complexo DCF Zn (11 mg/kg, n = 3-5). A fração de excreção de  $\text{Na}^+$  foi avaliada nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \*p < 0,05 vs ACL ou SAL (A); #p < 0,05 vs SAL no mesmo dia de tratamento (B, D0, D4 e D8).

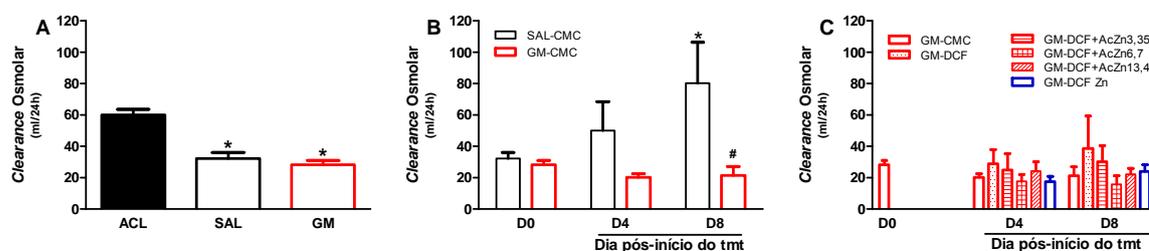
A excreção urinária do  $\text{K}^+$  está mostrada na Figura 9. Semelhantemente à excreção do  $\text{Na}^+$ , a GM, por si só, aumentou a fração de excreção de  $\text{K}^+$  (Fig. 9A), tanto em comparação com a fração no período de aclimatação, como com a fração no grupo controle (SAL). Essa fração aumentada ainda persistia no 4º (D4) e 8º (D8) dias após o início do tratamento com CMC (4 dias após a interrupção da administração de GM) (Fig. 9B). Nos grupos tratados com DCF livre e com DCF associado a 3 doses de acetato de zinco, embora tenha havido, em alguns grupos, uma tendência de queda da fração de excreção de  $\text{K}^+$  no 4º (D4) e 8º dias (D8) de tratamento com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 9C), a mesma não alcançou significância estatística. A fração de excreção de  $\text{K}^+$  também não foi estatisticamente diferente quando os grupos foram comparados no mesmo dia de tratamento (D4 ou D8, Fig. 9C). Perfil semelhante foi observado no grupo tratado com o complexo DCF Zn principalmente no 4º (D4) dia após o início de tratamento com relação ao D0 (antes do início do tratamento) (Fig. 9C). Também não foi observada nenhuma diferença quando os grupos foram comparados no mesmo dia de tratamento (D4 ou D8, Fig. 9C).



**Figura 9.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre a fração de excreção de  $\text{K}^+$  em ratos com NTA

induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias,  $n = 36$ ) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle,  $n = 5$ ); ACL, aclimação ( $n = 42$ ). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre a fração de excreção de  $K^+$  em ratos normais (SAL-CMC,  $n = 3-5$ ) e ratos com NTA (GM-CMC,  $n = 6-36$ ). A fração de excreção de  $K^+$  foi avaliada no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre a fração de excreção de  $K^+$  em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg,  $n = 3-4$ ), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg,  $n = 3-5$ , 6,7 mg/kg,  $n = 3-6$  e 13,4 mg/kg,  $n = 4-6$ ) e o complexo DCF Zn (11 mg/kg,  $n = 4-6$ ). A fração de excreção de  $K^+$  foi avaliada nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \* $p < 0,05$  vs ACL ou SAL (A); # $p < 0,05$  vs SAL no mesmo dia de tratamento (B, D0, D4 e D8).

Conforme pode ser observado pela Figura 10, o *clearance* osmolar apresentou-se reduzido tanto no grupo tratado apenas com GM, como no grupo que recebeu apenas salina (grupo controle) quando em comparação ao período de aclimação (Fig. 10A). Dentro do grupo controle, o *clearance* osmolar mostrou-se elevado no 8º dia (D8) após o início do tratamento em comparação ao D0 do mesmo grupo (Fig. 10B). Ao contrário, o *clearance* osmolar, no grupo GM-CMC, também estava bastante diminuído no 8º (D8) dia após o início do tratamento com CMC quando comparado com o grupo SAL-CMC no mesmo dia (8º) (Fig. 10B). Nos grupos tratados com DCF livre e com DCF associado a 3 doses de acetato de zinco, nenhuma alteração significativa foi detectada (Fig. 10C). De forma semelhante, o complexo DCF Zn não produziu qualquer efeito distinto quando em comparação com os demais grupos onde se testou o DCF livre ou em associação ao acetato de zinco (Fig 10C).



**Figura 10.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou

associado ao acetato de zinco sobre o *clearance* osmolar em ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias, n = 36) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle, n = 6); ACL, aclimatação (n= 42). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre o *clearance* osmolar em ratos normais (SAL-CMC, n = 3-6) e ratos com NTA (GM-CMC, n = 5-36). O *clearance* osmolar foi avaliado no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre o *clearance* osmolar em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg, n = 4), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 4, 6,7 mg/kg, n = 3-5 e 13,4 mg/kg, n = 5-6) e o complexo DCF Zn (11 mg/kg, n = 5-6). O *clearance* osmolar foi avaliado nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \*p <0,05 vs ACL (A) e vs D0 do mesmo grupo (B); #p < 0,05 vs SAL no mesmo dia de tratamento (B, D8).

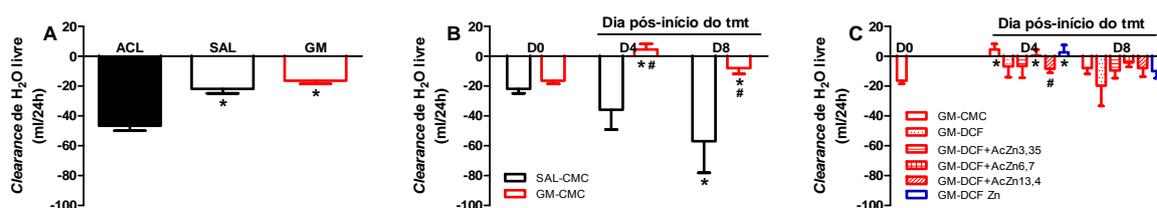
Os resultados obtidos para o *clearance* de água livre encontram-se na Figura 11. Esse parâmetro mostrou-se menos negativo tanto no grupo tratado apenas com GM, como no grupo que recebeu apenas salina (grupo controle) quando em comparação ao período de aclimatação (Fig. 11A). Dentro do grupo controle, o *clearance* de água livre mostrou-se mais negativo no 8º dia (D8) após o início do tratamento (dia após o término do tratamento) em comparação ao D0 do mesmo grupo (Fig. 11B).

Já dentro do grupo GM-CMC, o *clearance* de água livre mostrou-se positivo no 4º dia e menos negativo no 8º dia (D8) após o início do tratamento (dia após o término do tratamento) em comparação ao D0 do mesmo grupo (Fig. 11B). O *clearance* de água livre, no grupo GM-CMC, mostrou-se bem distinto do que foi observado no grupo SAL-CMC, apresentando-se positivo no 4º dia (D4) e menos negativo no 8º (D8) dia após o início do tratamento com CMC quando comparado com o grupo SAL-CMC nos mesmos dias (4º e 8º) (Fig. 11B).

No grupo com NTA tratado com DCF livre associado ao acetato de zinco (6,7 mg/kg, grupo GM-DCF+AcZn6,7) acentuou ainda mais o efeito da GM, pois, o valor do *clearance* de água livre foi próximo de zero, no D4, quando comparado com o *clearance* medido no D0 (Fig. 11C). Interessante notar que, ainda no 4º dia, o DCF livre associado à dose mais alta de acetato de zinco (13,4 mg/kg, grupo GM-DCF+AcZn13,4), o *clearance* de água livre tornou-se mais negativo em comparação ao grupo com NTA apenas (GM-CMC, D4) (Fig. 11C) com o valor de

*clearance* aproximando-se do valor observado no D0. No 8º dia, nenhuma alteração significativa foi detectada em nenhum dos grupos tratados (Fig. 11C).

No tratamento com o complexo DCF Zn (grupo GM-DCF Zn), o *clearance* de água livre tornou-se ligeiramente positivo no 4º dia após o início de tratamento, quando comparado com o *clearance* medido no D0 (dia antes do início do tratamento) (D4, Fig. 11C) dos animais do com NTA apenas (GM-CMC, D4), com o valor de *clearance* também se aproximando do valor observado no D0. No 8º dia, o complexo DCF Zn não produziu qualquer efeito distinto quando em comparação com o D0 ou em comparação com os demais grupos testados sendo, o *clearance* de água livre similar àquele obtido com o DCF livre associado ao acetato de zinco (13,4 mg/kg, grupo GM-DCF+AcZn13,4) (D8, Fig. 11C).

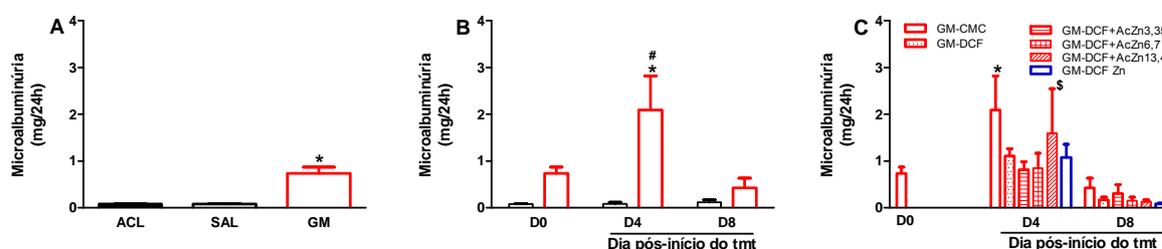


**Figura 11.** Efeito do complexo DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre o *clearance* de água livre em ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias, n = 36) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle, n = 6); ACL, aclimação (n= 42). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre o *clearance* de água livre em ratos normais (SAL-CMC, n = 3-6) e ratos com NTA (GM-CMC, n = 5-36). O *clearance* de água livre foi avaliado no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre o *clearance* de água livre em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg, n = 4), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 4, 6,7 mg/kg, n = 3-5 e 13,4 mg/kg, n = 5-6) e o complexo DCF Zn (11 mg/kg, n = 5-6). O *clearance* de água livre foi avaliado nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \*p < 0,05 vs ACL (A) e vs D0 do mesmo grupo (B, C e D); #p < 0,05 vs SAL-CMC no mesmo dia de tratamento (B, D8), #p < 0,05 vs GM-CMC no mesmo dia de tratamento (C, D4).

### 4.3 Análise morfológica e microalbuminúria

A microalbuminúria (perda de pequenas quantidades de albumina na urina) permite uma avaliação da disfunção glomerular nos seus estágios bem iniciais. Por isso, neste trabalho, foi utilizada a técnica apropriada para a detecção da presença de quantidades muito baixas de albumina na urina. A Figura 12 mostra que a GM, por si só, aumentou a microalbuminúria (Fig. 12A), aumento este, que persistiu até o 4º dia de tratamento com CMC (4 dias após a interrupção da administração de GM) (Fig. 12B).

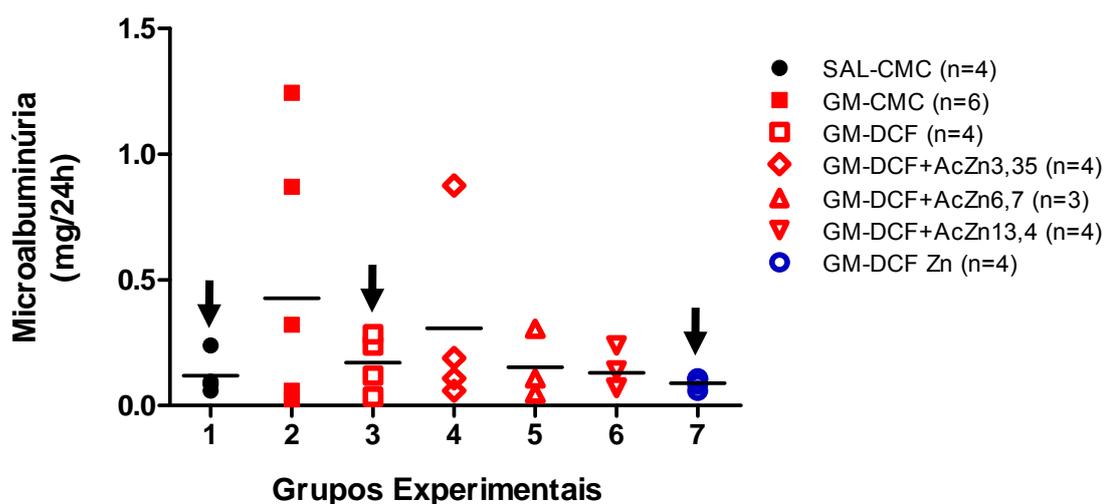
No grupo com NTA tratado com DCF livre associado à dose mais alta de acetato de zinco (13,4 mg/kg, grupo GM-DCF+AcZn13,4), embora não estatisticamente significativa ( $p = 0,08$ ), a microalbuminúria estava elevada no 4º dia (D4) pós-início do tratamento em comparação ao D0 do grupo com NTA apenas (GM-CMC) (Fig. 12C). No 8º dia, os valores de microalbuminúria foram baixos, porém, não diferentes daqueles valores de D0 ou D4 (Fig. 12C). O tratamento com o composto DCF Zn (grupo GM-DCF Zn) não afetou a microalbuminúria, no 4º dia pós-início de tratamento, tanto quando comparado com a microalbuminúria medida no D0 (dia antes do início do tratamento) em relação à medida nos animais com NTA apenas (GM-CMC, D4) (Fig. 12C). Já no 8º dia, embora sem significância estatística, o complexo DCF Zn bem como o DCF livre ou associado ao acetato de zinco (13,4 mg/kg, grupo GM-DCF+AcZn13,4) (D8, Fig. 12C) promoveram uma redução discreta da microalbuminúria. Esta microalbuminúria, medida no D8, será analisada com mais detalhes, a seguir.



**Figura 12.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre a microalbuminúria em ratos com NTA

induzida pela gentamicina (GM). **A**, efeito da administração apenas de GM (5 dias, n = 36) para indução de NTA; SAL, salina (NaCl 0,9%, controle, n = 6); ACL, aclimação (n = 42). **B**, efeito do tratamento, por 7 dias com CMC (0,5 ml/100 g) sobre a microalbuminúria em ratos normais (SAL-CMC, n = 4-6) e ratos com NTA (GM-CMC, n = 5-36). A microalbuminúria foi avaliada no 4º dia de tratamento (D4) e no dia seguinte ao final do mesmo (D8). **C**, comparação do efeito do tratamento (7 dias), sobre a microalbuminúria em ratos com NTA e DCF livre (10 mg/kg, n = 4-5), DCF livre (10 mg/kg) associado ao acetato de zinco (AcZn 3,35 mg/kg, n = 4-6, 6,7 mg/kg, n = 3-6 e 13,4 mg/kg, n = 4-6) e o complexo DCF Zn (11 mg/kg, n = 4-6). A microalbuminúria foi avaliada nos mesmos dias (D4 e D8) como já descrito em **B**. D0, aproximadamente 24 h após o término da administração de GM. CMC, carboximetilcelulose. \*p <0,05 vs ACL ou SAL (A) e vs D0 no mesmo grupo; #p < 0,05 vs SAL-CMC no mesmo dia de tratamento (B, D4); §p = 0,08 vs D0.

A Figura 13 mostra um *scatter plot* dos valores de microalbuminúria obtidos nos 7 grupos experimentais no 8º dia após o início do tratamento, um dia após o término do tratamento com os diferentes compostos testados. A microalbuminúria no grupo com NTA apenas (Fig. 13, **2**) encontra-se aumentada em relação ao grupo controle (Fig. 13, **1**). Apesar da grande dispersão apresentada em alguns grupos, pode-se observar que o DCF livre ou a associação do DCF com acetato de zinco (3,35 a 13,7 mg/kg) (Fig. 13, **3**, **4**, **5** e **6**) diminuíram a microalbuminúria quando comparada com os ratos com NTA induzida pela GM (Fig. 13, **2**). Por outro lado, a microalbuminúria observada no grupo que recebeu apenas DCF livre apresentou-se ligeiramente reduzida quando comparada com os grupos **2** e **4** (Fig. 13). Mas, este valor ainda foi ligeiramente superior ao observado nos grupos **1** e **7** (Fig. 13). Embora sem significância estatística, a microalbuminúria obtida no grupo tratado com o complexo DCF Zn foi ligeiramente inferior àquela medida no grupo DCF livre apenas (Fig. 13, **3**) e muito semelhante à observada no grupo controle (Fig. 13, **1**).



**Figura 13.** Efeito do novo complexo DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre a microalbuminúria em ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). Os símbolos representam valores individuais de microalbuminúria obtidos no 8º dia após o início do tratamento por 7 dias, com as substâncias sob estudo.

Finalmente, a análise histopatológica renal dos ratos do grupo 1 (SAL-CMC, controle) mostrou aspecto morfológico normal, com preservação da arquitetura do parênquima renal. Nos animais do grupo 2 (GM-CMC), o epitélio tubular proximal mostrou-se vacuolizado e/ou acidófilo com contração nuclear, caracterizando necrose tubular focal. Também foi observada nefrite intersticial crônica focal e difusa constituída por infiltrado inflamatório de células mononucleares. O mesmo aspecto histopatológico do grupo 2 foi observado nos animais do grupo 3 (GM-DCF), contudo, de maior intensidade e com a presença de hemorragia, cilindros hemáticos e hialinos (Fig. 14A). Nos animais do grupo 4 (GM-DCF + AcZn 3,35), o aspecto histopatológico foi semelhante ao observado nos rins de ratos do grupo 3 (Fig. 14B). As alterações renais encontradas nos animais do grupo 3 mostraram-se moderadamente reduzidas nos animais dos grupos 5 (GM-DCF + AcZn 6,7) e 6 (GM-DCF + AcZn 13,4 (Fig. 14C). Os animais do grupo 7 (GM-DCF Zn) apresentaram redução do infiltrado inflamatório e dos fenômenos regressivos quando comparado com os animais do grupo 3 e 4, com aspecto equivalente ao intermediário entre os grupos 2 e 3 (Fig. 14D).

**Figura 14.** Efeito do novo composto DCF Zn comparado ao efeito do DCF livre ou associado ao acetato de zinco sobre o aspecto morfológico de rins de ratos com NTA induzida pela gentamicina (GM). **A**, Rim de rato com NTA tratado com DCF livre (10 mg/kg, grupo GM-DCF). Observa-se nefrite intersticial crônica, caracterizada por intenso infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, e necrose tubular focal em parênquima renal. **B**, Rim de rato com NTA tratado com DCF livre associado ao acetato de zinco (3,35 mg/kg, grupo GM-DCF+AcZn3,35). Neste grupo, o aspecto histopatológico foi semelhante ao mostrado em **A**. **C**, Processo inflamatório e alterações celulares moderadas, em comparação ao apresentado em **A** e **B**, em rins de ratos dos grupos GM-DCF+AcZn6,7 e GM-DCF+AcZn13,4. **D**, Rim de rato com NTA tratado com DCF Zn (11 mg/kg). Observa-se nefrite e necrose discretas com redução do infiltrado inflamatório quando comparado ao mostrado em **A**, **B** e **C**. Hematoxilina & Eosina. X100.

## 5 DISCUSSÃO

A busca por antiinflamatórios seguros continuam sendo de grande interesse constituindo alvo de muitos trabalhos de pesquisa. Uma das alternativas para se buscar esses medicamentos com baixos índices de reações adversas tem sido por rearranjo molecular de fármacos com atividade farmacológica já comprovada (GARNER, 1992), processo conhecido como inovação incremental.

O diclofenaco (DCF) é um fármaco largamente prescrito e comercializado. Entretanto, apresenta grande incidência de reações adversas, principalmente ulceração e intolerância gastrointestinal, o que torna limitante sua prescrição como antiinflamatório (MULLER et al., 2004; JONES, 2001; HAWKEY et al., 2000; McCARTHY, 1998; ANDRADE, 1998).

Uma das alternativas para diminuir os efeitos adversos gastrointestinais do DCF tem sido o uso simultâneo do cloreto de zinco, sulfato de zinco ou acexamato de zinco. Todas as associações apresentaram efeito gastroprotetor satisfatório, entretanto, o uso simultâneo de medicamentos torna-se um fator dificultador na adesão do paciente à terapia (SANTOS et al., 2004; ABOU-MOHAMED et al., 1995; RODRIGUES DE LA SERNA & DIAZ-RUBIO, 1994).

SANTOS (2001), pesquisando o complexo diclofenaco-zinco (DCF Zn), concluiu que o agravamento da irritação gástrica foi significativamente menor com o referido complexo quando comparado com o DCF livre.

Por serem as drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINE) capazes de exercer efeitos prejudiciais à função renal (JUHLIN et al., 2004), o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito do complexo DCF Zn sobre sobre parâmetros da função renal de ratos com necrose tubular aguda (NTA) induzida pelo antibiótico GM.

O protocolo utilizado para a indução da NTA pela GM foi o mesmo já validado em nosso laboratório por PACHECO (2009). Utilizando esse modelo, PACHECO (2009) relatou que a GM provocava diminuição no peso dos animais ao final do

tratamento com a mesma. Entretanto, não observamos diferenças significativas no peso dos animais durante os períodos da aclimação quando comparado ao peso dos animais do grupo controle que receberam salina e o dos animais que receberam GM para indução da NTA. Durante o tratamento com CMC, DCF livre, DCF associado ao AcZn (3 concentrações diferentes) e o complexo DCF Zn também não observamos diferenças significativas no peso corporal dos animais. Diferentemente dos nossos estudos, BESEN (2009) constatou, em seu trabalho, redução significativa do peso corporal nos ratos que receberam DCF em comparação com os animais que receberam placebo.

A ingestão de água pelos animais não foi diferente quando comparada aos animais na aclimação e quando os mesmos receberam salina ou gentamicina. Diferentemente, COSENZA (2010) relatou maior variação no volume de água ingerida pelos animais que receberam GM. No presente estudo, no entanto, durante o tratamento com CMC, DCF livre, DCF associado ao AcZn e o complexo DCF Zn, nenhuma alteração significativa foi detectada na ingestão de água quando todos os grupos foram comparados.

O balanço hídrico mostrou-se significativamente aumentado ao final da administração de GM, permanecendo elevado até o 4º dia após a interrupção dessa administração. Este aumento no balanço, que é a razão entre o FU e o volume de água ingerido pode ser explicado pelo fato de que enquanto a ingestão de água não tenha sido afetada, a GM aumentou o fluxo urinário (FU). Porém, nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos tratados com DCF livre ou DCF associado ao AcZn. Igualmente, o complexo DCF Zn não afetou, de forma significativa, o balanço hídrico já aumentado pela GM.

A GM aumentou a concentração plasmática de creatinina quando comparada aos animais no período da aclimação ou aos animais que receberam salina, mantendo-se aumentada até o 4º dia após a interrupção da administração desse fármaco. Esse efeito, observado na indução de NTA com GM está de acordo com relatos de diversos autores (CHRISTO et al., 2011; PATEL, 2011; SAFA et al., 2010; CAO et al., 2010; PACHECO, 2009).

No 4º dia de tratamento com DCF livre, DCF associado ao AcZn ou com o complexo DCF Zn, a concentração plasmática de creatinina permaneceu elevada, quando comparada ao dia anterior ao início do tratamento (D0), mas não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados. No 8º dia após o início do tratamento, a concentração plasmática de creatinina já havia retornado a valores similares a D0, porém sem diferenças significativas entre os grupos. Embora, os nossos dados não se assemelhem àqueles relatados por outros autores como BESEN et al. (2009) e WHELTON et al. (2006) que observaram alterações na creatinina plasmática de animais que receberam DCF, os mesmos estão em concordância com o trabalho de FARKER (1995) que observou uma redução da depuração renal de creatinina em voluntários saudáveis após o uso de DCF, por 4 dias.

Os resultados obtidos para o RFG estão de acordo com os resultados encontrados para a creatinina plasmática e os encontrados por outros pesquisadores (KATAYAMA et al., 2010; PATIL et al., 2010; PACHECO, 2009). Ou seja, a GM causou NTA e diminuiu o RFG, quando comparado aos animais no período da aclimação e aos animais que receberam salina.

A redução do RFG produzida pela GM, pode ser observada durante todo o tratamento quando comparado ao grupo salina (controle) nos mesmos tempos avaliados (D4 e D8). Embora sem alcançar significância estatística, o tratamento com DCF associado ao AcZn tendeu a diminuir ainda mais o RFG já bastante reduzido pela GM. Isto significa uma acentuação do efeito GM levando a uma piora da filtração glomerular pelo DCF associado ao AcZn. Observação similar foi obtida com o complexo DCF Zn que também tendeu a acentuar o efeito da GM. A diminuição do RFG pelo DCF também tem sido relatada por outros autores (MUNGER et al., 2008; JUHLIN, 2007).

A GM, por si só, aumentou o FU sendo que, este aumento, persistiu até o 4º dia após o término da administração do antibiótico (4º dia pós-início de tratamento). Nossos resultados estão de acordo com o relato de MORALES et al. (2002), que também observou um aumento do FU em animais que receberam GM para indução da NTA. A GM produz injúria renal associada à diminuição da reabsorção tubular

de água livre e aumento do FU. A GM compromete a formação de AMP cíclico, o que reduz a mobilização das aquaporinas para a membrana apical das células principais, promovendo a diminuição da reabsorção de água no ducto coletor e levando ao aumento na excreção de água (LEE et al., 2001).

Em nosso estudo, o tratamento com DCF livre, DCF associado ao AcZn e mesmo o complexo DCF Zn não produziu qualquer interferência significativa no aumento de FU induzido pela GM, o que está em concordância com os trabalhos desenvolvidos por ELDIN (2008).

Como esperado, a fração de excreção de água foi aumentada pela GM, visto que a mesma fração é inversamente proporcional ao RFG e diretamente proporcional ao FU. Resultado similar foi obtido por COSENZA (2010). O aumento da FE<sub>água</sub> persistiu após o término da administração da GM permanecendo até o 8º dia após o início do tratamento com os compostos sob estudo. Interessante notar que o tratamento com DCF associado à dose mais baixa de AcZn (3,35 mg/kg) significativamente exacerbou a excreção de água (Fig. 7C), enquanto que a associação do DCF à dose mais alta de AcZn (13,4 mg/kg) houve redução significativa desse mesmo parâmetro (Fig. 7C). O complexo DCF Zn não apresentou nenhum efeito (melhora ou piora) sobre a FE<sub>água</sub> com relação à GM apenas.

A excreção de Na<sup>+</sup>, conforme esperado, foi elevada pela GM, aumento este, que persistiu até o 8º dia após o início de tratamento. A FE<sub>Na<sup>+</sup></sub> elevada após indução de NTA com GM quando em comparação aos animais na aclimatação e aos animais que receberam salina, está em conformidade com o observado por PATEL, DESHPANDE & SHAH (2011). Embora não significativo, o DCF associado a 2 concentrações de AcZn (6,7 e 13,4 mg/kg) tendeu a diminuir a excreção elevada de Na<sup>+</sup> promovida pela GM. Similarmente e também sem alcançar significância estatística, o complexo DCF Zn reduziu a FE<sub>Na<sup>+</sup></sub> que se encontrava elevada pela GM (Fig. 8C). Nossa observação está de acordo com dados relatados por autores como JUHLIN et al. (2007) e BESEN et al. (2009).

Como observado para o  $\text{Na}^+$ , a  $\text{FEK}^+$  também foi elevada pela GM, aumento este, que persistiu até o 8º dia após o início de tratamento.

Embora não significativo, o DCF associado a 13,7 mg/kg de AcZn reduziu a excreção elevada de  $\text{K}^+$  promovida pela GM. Já o complexo DCF Zn não produziu qualquer alteração significativa no aumento da  $\text{FEK}^+$  promovido pela GM (Fig. 9C). Nossos dados estão em discordância com o relato de BESEN (2009) que não observou alteração significativa na  $\text{FEK}^+$  em resposta à GM.

O *clearance* osmolar, apresentou-se diminuído tanto nos ratos que receberam salina (controle), quanto nos ratos que receberam GM, quando em comparação ao período de aclimatação. No entanto, ao receberem CMC, os ratos controles apresentaram um *clearance* osmolar bem superior àquele observado nos ratos com NTA induzida pela GM. O tratamento com DCF livre, DCF associado ao AcZn ou com o complexo DCF Zn não produziu qualquer efeito significativo sobre o *clearance* osmolar, embora BESEN (2009) tenha relatado que o DCF diminuiu este *clearance*. Embora as razões para tal discrepância não estejam evidentes, podemos especular que o procedimento em condições experimentais por ele utilizados são distintas daquelas usadas nesse estudo.

De forma semelhante ao observado para o *clearance* osmolar, o *clearance* de água livre apresentou-se diminuído (menos negativo) tanto nos ratos que receberam salina (controle), quanto nos ratos que receberam GM, quando em comparação ao período de aclimatação. No entanto, ao receberem CMC, os ratos controles apresentaram *clearance* de água livre negativo; ao contrário dos ratos com NTA induzida pela GM que apresentaram *clearance* positivo (D4) ou apenas ligeiramente negativo (D8) (Fig. 11B). O tratamento com DCF associado à dose mais alta de AcZn (13,4 mg/kg) tornou o *clearance* de água livre mais negativo, o que significa que não houve agravamento do efeito da GM, no 4º dia (D4). Embora não significativo, perfil similar foi observado para o complexo DCF Zn no 8º dia após o início do tratamento (D8). Segundo JUHLIN (2007), o DCF induziu redução do *clearance* de água. Similarmente, observamos *clearance* de água livre menos negativo (reduzido) em resposta ao DCF livre.

Uma vez que a microalbuminúria é um parâmetro que nos permite avaliar a disfunção glomerular nos seus estágios iniciais, a mesma foi determinada com o

intuito de auxiliar na detecção e comparação de possíveis efeitos do DCF livre, DCF associado ao AcZn com o possível efeito do novo complexo DCF Zn. Pode-se observar aumento desse parâmetro nos animais que receberam GM em comparação aos animais no período de aclimação e aos animais que receberam salina. Este aumento persistiu até o 4º dia após o término da indução da NTA, como observado por BANDAY (2008). No tratamento, por 4 dias (D4), com DCF livre e DCF associado com AcZn, nas doses de 3,35 e 6,7 mg/kg, houve tendência de redução da microalbuminúria que se encontrava elevada pela GM. O DCF associado ao Ac Zn na concentração de 13,4 mg/kg tendeu a piorar o quadro da microalbuminúria, tornando-o similar ao observado para a GM sozinha (D4, Fig. 12C). Ao contrário das nossas observações, MAWANDA (2011) relatou um aumento da microalbuminúria em pacientes tratados com DCF. No entanto, o estado basal desses pacientes apresentaram-se diferentes das condições experimentais por nós utilizadas, pois a investigação do efeito dos compostos foi feita em ratos que apresentavam NTA induzida pelo antibiótico GM.

O *scatter plot* mostrado na Figura 13, compara a microalbuminúria, no 8º dia após o início de tratamento em todos os grupos experimentais utilizados neste estudo. Apesar da variabilidade apresentada em alguns grupos, pode-se observar que o DCF livre ou associado ao AcZn, principalmente, nas doses mais elevadas (6,7 e 13,4 mg/kg) tendeu a melhorar, ou seja, reduziu a microalbuminúria que foi aumentada pela GM. Uma observação mais minuciosa da Figura 13, nos permite notar que a microalbuminúria no grupo que recebeu o complexo DCF Zn (grupo 7) foi ainda mais reduzida do que aquela dos grupos DCF livre (Fig. 13, grupo 3) ou DCF associado às 3 doses de AcZn (Fig. 13, grupos 4 a 6) exibindo uma microalbuminúria com valores muito similares aos valores obtidos no grupo controle (Fig. 13, grupo 1).

A análise histopatológica nos mostra que a GM causou necrose tubular focal, em consonância com o trabalho descrito por PATELL (2011), sendo que nefrite intersticial crônica focal e difusa, constituída por infiltrado inflamatório de células mononucleares, também foi observada. No grupo tratado com DCF (grupo 3), apenas foi observado o mesmo aspecto histopatológico do grupo 2 (GM-CMC), porém, de maior intensidade e com a presença de hemorragia, cilindros hemáticos

e hialinos, ou seja, o DCF produziu uma piora do quadro histopatológico já comprometido pela GM. O quadro observado para o DCF sozinho foi semelhante ao obtido com DCF associado à dose mais baixa de AcZn (3,35 mg/kg). As alterações renais causadas pelo DCF apenas, mostraram-se moderadamente reduzidas nos grupos que receberam DCF associado às doses mais elevadas de AcZn (6,7 e 13,4 mg/kg). Estas observações indicam que o uso do DCF de sódio em situação em que já há dano renal, como a utilizada nesse estudo (NTA induzida por GM), pode intensificar a injúria do tecido renal. No entanto, a simples associação do DCF com doses mais altas de AcZn exibe um efeito mais benéfico sobre os danos renais causados. Mais eficaz, porém, o complexo DCF Zn promoveu redução do infiltrado inflamatório e dos fenômenos regressivos quando comparado com os animais que receberam apenas DCF ou DCF associado a 3,35 mg/kg de ACZn. Isto sugere que entre todos os tratamentos, o complexo DCF Zn apresentou maior efeito benéfico contra os danos renais produzidos pela GM.

## 6 CONCLUSÕES

**6.1** O modelo de necrose tubular aguda (NTA) causada pela GM foi adequado já que promoveu as alterações que caracterizam a lesão renal desejada: aumento da concentração plasmática da creatinina, redução da filtração glomerular, aumento do fluxo urinário, aumento da excreção da água, aumento da excreção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ .

**6.2** O complexo DCF Zn não produziu mudanças significativas nos parâmetros renais que já se encontravam alterados pela GM, mostrando ser esse complexo um agente seguro por não acentuar significativamente o efeito da gentamicina na injúria renal.

**6.3** O complexo DCF Zn apresenta formulação farmacêutica única, facilitando a adesão ao tratamento.

**6.4** A reduzida microalbuminúria e a melhoria dos danos renais evidenciados na análise morfológica do grupo que recebeu o complexo DCF Zn poderia fazer desse complexo um antiinflamatório de escolha em situação patológica onde há disfunção renal similar àquela apresentada neste estudo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-MOHAMED, G.; EL-KASHEF, H.; SALEM, H. A.; ELMAZAR, M. M. Effect of zinc on the anti-inflammatory and ulcerogenic activities of indometacin and diclofenac. *Pharmacol.*, v. 50, p. 266-272, 1995.

AGUIAR, F. A. *Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação dessas propriedades no perfil in vitro de dissolução e no efeito farmacológico*. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALBERS J. M.; KUPER, H. H.; VAN RIEL, P.L.; PREVOO, M. L.; VAN'T HOF, M. A.; VAN GESTEL, A. M.; SEREVEN, J. L. Socio-economic consequences of rheumatoid arthritis in the first years of the diseases. *Rheumat.*, v. 38, n. 5, p. 423-430, 1999.

ANDRADE, S. E.; MARTINEZ, C.; WALKER, A. M. Comparative safety evaluation of non-narcotic analgesics. *J. Clin. Epidemiol.*, v. 51, n. 12, p. 1357-1365, 1988.

ARENDRT-NIELSEN, L.; GRAVEN-NIELSEN, T. Muscle pain: sensory implication and interaction with motor control. *The Clinical Journal of Pain*, v. 24, n. 4, p. 291-298, 2008.

BANDAY, A. A.; FAROOQ, N.; PRIYAMVADA, S.; YUSIFU, A. N. K.; KHAN, F. Time dependet effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life Sciences*, v. 82, p. 450-459, 2008.

BARBOSA, C. M.; SAKATE, M.; CAMPRESI, A. C.; VAILATI, M. C. F.; MORAES, L. F.; TAKAHIRA, R. K. Avaliações hematológicas e bioquímicas do uso de diclofenaco de sódio, meloxicam e firocoxibe em ratos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 47, n. 2, p. 117-124, 2010.

BAUM, M. K.; POSNER-SHOR, G.; CAMPA, A. Zinc status in human immunodeficiency virus infection. *J Nutr*, n. 130, Suppl, p. 1421-1423, 2000.

BECKER, M. A.; SCHUMACHER, H. R. Jr.; WORTMANN, R. L. *et al.* Febuxostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase: a twenty-eight-day, multicenter, phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response

clinical trial examining safety and efficacy in patients with gout. *Arthritis Rheum*, v. 52, p. 916-923, 2005.

BENSEN, W. Aim for remission or "personal best" using combination DMARD therapy with methotrexate and hydroxychloroquine. *Clin Exp. Rheumatol*, v. 17, n. 6, Suppl 18, p. S95-101, 1999.

BENSON, M. D.; ALDO-BENSON, M.; BRANT, K. D. Synovial fluid concentrations of diclofenac in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Simin Arthritis Rheum*, v. 15, n. 2, Suppl. 1, p. 65-67, 1985.

BÉRTOLO, M. B.; BRENOL, C. V.; SCHAINBERG, C. G.; NEUBARTH, F.; LIMA, F. A. C.; LAURINDO, I. M.; SILVEIRA, I. G.; PEREIRA, I. A.; LOURES, M. A. R.; AZEVEDO, M. N.; FREITAS, M. V. C.; PEDREIRA NETO, M. S.; XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; KOWALSKI, S. C.; ANTI, S. M. A. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol*, v. 47, n. 3, p. 151-159, maio/jun. 2007.

BESEN, A.; KOSE, F.; PAYDAS, S.; GONLUSEN, G.; INAL, T.; DOGAN, A.; KIBAR, M.; BALAL, M. The effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium on the rat kidney, and alteration by furosemide. *Int Urol Nephrol*, v. 41, n. 4, p. 919-926, Dec. 2009.

BURKE, A.; SMYTH, E. M.; FITZGERALD, G. A. Analgésicos, antipiréticos; farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. São Paulo: Mc Graw Hill, 2006. cap. 26, p. 601-638.

BURKE, A.; SMYTH, E. M.; FITZGERALD, G. A. Analgesics-antipyretics and antiinflammatory agents: pharmacotherapy of gout. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). *The pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2005. cap. 26, p. 671-715.

CAMPEBELL, R. C.; PEIRÓ, J. R.; ROSA, P. C. S.; VALADÃO, C. A. A.; BECHARA, G. H. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em equinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, Aug. 2007.

CAO, J.; YANG, X. D.; WANG, X. Y.; QU, L.; LIU, G.; LI, X. M. [Differential changes of intrarenal oxygenation in rat models of acute tubular necrosis caused by

aristolochic acid and gentamicin]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, v. 90, n. 17, p. 1208-1212, May 2010.

CARDOSO, M. M. S. C.; CARVALHO, J. C. A.; AMARO, A. R. *et al.* Small doses of spinal morphine combined with systemic diclofenac for postoperative analgesia after cesarean delivery. *Anesth Analg*, v. 86, p. 538-541, 1998.

CARDOSO, M. M. S. C.; CARVALHO, J. C. A.; TAHAMTANI, S. M. M. Diclofenaco por via muscular ou retal associado com baixas doses de morfina subaracnóidea para analgesia pós-operatória em cesarianas *Rev. Bras. Anesthesiol.*, Campinas, v. 52, n. 6, nov./dez. 2002.

CARRERA, E. F. *Ombro: síndrome do impacto: guias de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP – EPM – Ortopedia e Traumatologia*. Coordenação deste guia Flávio Faloppa, Walter Manna Albertoni. Baueri, SP: Manole, 2008.

CARVALHO, W. A. Anti-inflamatórios não esteróides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota. In: SILVA, P. (Ed.). *Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. cap. 45, p.439-466.

CASTRO, A. B. Síndrome do impacto do ombro. Diagnóstico e tratamento. *Rev Dor*, v. 10, n. 2, p. 174-179, 2009.

CHAN, K. K. H.; VYAS, K. H.; BRANDT, K. D. In vitro protein binding of diclofenac sodium in plasma and synovial fluid. *J Pharm Sci*, v. 76, n. 2, p.105-108, 1987.

CHRISTO, J. S.; RODRIGUES, A. M.; MOURO, M. G.; CENEDEZE, M. A.; SIMÕES MDE, J.; SCHOR, N.; HIGA, E. M. Nitric oxide (NO) is associated with gentamicin (GENTA) nephrotoxicity and the renal function recovery after suspension of GENTA treatment in rats. *Nitric Oxide*. v. 24, n. 2, p. 77-83, Mar. 2011.

COHEN, E.; HAFNER, R.; ROTENBERG, Z.; FADILLA, M.; GARTY, M. Comparison of ketorolac and diclofenac in the treatment of renal colic. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 54, n. 6, p. 455-458, Aug. 1998.

COSENZA, G. P. *Efeito do extrato bruto das folhas de Echinodorus macrophyllus e de frações semipurificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina*. 2010. Tese (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CROOK, P. R.; WILLIS, J. V.; KENDALL, M. J.; JACK, D. B.; FOWLER, P. D. The pharmacokinetics of diclofenac sodium in patients with active rheumatoid disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 21, p. 331-334, 1982.

DAHL, V.; RAEDER, J. C. Non-opioid postoperative analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand*, v. 44, n. 10, p. 1191-1203, Nov. 2000.

DAVIES, N. M.; ANDERSON, K. E. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls, *Clin Pharmacokinet*, v. 33, n. 3, p.184-213, Sept. 1997.

DEGEN, P. H.; DIETERLE, W.; SCHNEIDER, W.; THEOBALD, W.; SINTERHAUF, U. Pharmacokinetics of diclofenac and five metabolites after single doses in healthy volunteers and after repeated doses in patients. *Xenobiotica*, v. 18, n. 12, p. 1449-1455, 1988.

DOAN T, M. E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. *J Clin Pharmacol*, v. 45, n. 7, p. 751-762, 2005.

ELDAD, A.; BENMEIR, P.; WEINBERG, A.; NEUMAN, A.; CHAOUT, M.; BEN-BASSAT, H. *et al.* Cyclosporin a treatment failed to extend skin allograft survival in two burn patients. *Burns*, v. 20, p. 262-264, 1994.

ELDIN, A. A.; SHAHEEN, A. A.; ABD ELGAWAD, H. M.; SHEHATA, N. I. Protective effect of taurine and quercetin against renal dysfunction associated with the combined use of gentamycin and diclofenac. *Indian J Biochem Biophys*, v. 45, n. 5, p. 332-340, Oct. 2008.

ESTÉVEZ, D. Q. Are selective COX-2 inhibitors a safe option in patients with intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs? *J Investig Allergol Immunol.*, v. 19, n. 4, p. 328-330, 2009.

FAN, P. T.; LEONG, K. H. The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore*, v. 36, n. 2, p. 128-134, Feb. 2007.

FARKER, K.; NASSR, N.; HUCK, F.; ZERLE, G.; ROSENKRANZ, B.; SCHMIEDER, G.; HOFFMANN, A. Dipyrrone and diclofenac do not influence creatinine-clearance, inulin-clearance or PAH-clearance in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*, v. 33, n. 3, p. 125-130, Mar. 1995.

FATURETO, M. C.; SIMÕES, M. J.; TEIXIERA, V. P. A.; GOLDENBERG, S. Aspectos morfológicos e morfométricos do processo inflamatório provocado por fio de catagute simples no subcutâneo de ratos tratados com diclofenaco sódico. *Acta. Cir. Bras*, v. 4, n. 1, p. 5-9, jan./mar. 1989.

FERRAZ, M. B.; SATO, E. I.; NISHIE, I. A.; VISINONI, R. A. Inquérito sobre hábito de prescrição de drogas na artrite gotosa hiperuricemia assintomática. *Rev. bras. reumatol*; v. 33, n. 3, p. 90-94, maio/jun. 1993.

FIGUEIRAS, A.; CAPELLA, D.; CASTERL, J. M.; LAORTE, J. R. Spontaneous reporting of adverse drug reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs. A report from the Spanish System of Pharmacovigilance, including an early analysis of topical and entericcoated formulations. *Eur J Pharmacol.*, v. 47, p. 297-303, 1994.

FOWLER, P. D.; SHADFORTH, M. F.; CROOK, P. R.; JOHN, V. A. Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its major hydroxylated metabolites during long-term treatment of rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol.*, v. 25, p. 389-394, 1983.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GAFFO, A.; SAAG, K. G.; CURTIS, J. R. Treatment of rheumatoid arthritis. *Am J Health Syst Pharm*, v. 63, n. 24, p. 2451-2465, Dec. 2006.

GARCIA FILHO, R. J.; KORUKIAN, M.; SANTOS, F. P. E.; VIOLA, D. C. M.; PUERTAS, E. B. Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, comparativo entre a associação de cafeína, carisoprodol, diclofenaco sódico e paracetamol e a ciclobenzaprina, para avaliação da eficácia e segurança no tratamento de pacientes com lombalgia e lombociatalgia agudas. *Acta Ortop Bras*, v. 14, n. 1, 2006.

GARGOT, D.; CHAUSSADE, D.; DALTEROCHE, L.; DESBAZEILLE, F.; GRANDJOUAN, S.; LOUVEL, A.; DOUVIN, J.; CAUSSE, X.; FESTIN, D.; CHAPUIS, Y. Nonsteroidal anti-inflammatory dru-induced colonic strictures: two cases and literature review. *Am J Gastroenterol*, v. 90, p. 2035-2038, 1995.

GARNER, A. Adaptation in the pharmaceutical industry, with particular reference to gastrointestinal drugs and disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, v. 193, p. 83-89, 1992.

GHERPELLI, J. L. D. Tratamento das cefaléias. *J Pediatr*, Rio de Janeiro, v. 78, Supl.1, p. S3-S8, 2002.

GUIDANCE for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Rockville: FDA, 2000, 13 p.

HÄMÄLÄINEN, M. L.; HOPPU, K.; VLAKEILA, E.; SANTAVUORI, P. R. Ibuprofen or acetaminophen for the acute treatment of migraine in children. *Neurology*, v. 48, p. 103-107, 1997.

HAMBIDGE, M. Human zinc deficiency. *J Nutr*, v. 130, Suppl, p. 1344-1349, 2000.

HARRIS, E. D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*, v. 322, p. 1277-1289, 1990.

HAWKEY, C. J.; CULLEN, D. J. E.; PEARSON, G. *et al.* Pharmacoepidemiology of nonsteroidal anti-inflammatory drug use in nottingham general practices. *Aliment Pharmacol. Ther.*, v. 14, n. 2, p. 177-185, 2000.

HUSSAIN, I.; KHAN, M. Z.; KHAN, A.; JAVED, I.; SALEEMI, M. K. Toxicological effects of diclofenac in four avian species. *Avian Pathol.*, v. 37, n. 3, p. 315-321, June, 2008.

JAWAD, F. To evaluate the role of diclofenac sodium on renal parenchyma of young albino rats. *Pak J Pharm Sci.*, v. 21, n. 3, p. 320, July 2008.

JOHN, V. A. The pharmacokinetics and metabolism of diclofenac sodium (votarol) in animals and man. *Rheumatol Rehabil*, Suppl. 2, p. 22-37, 1979.

JONES, R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. *Am J Med*, v. 110, n. 1A, p. 4S-7S, 2001.

JORDAN, K. M. *et al.* British Society for Rheumatology and British health professionals in rheumatology guideline for the management of gout. *Rheumatology*, v. 46, n. 8, p. 1372-1374, 2007.

JUHLIN, T.; ERHARDT, L. R.; OTTOSSON, H.; JÖNSSON, B. A.; HÖGLUND, P. Treatments with losartan or enalapril are equally sensitive to deterioration in renal

function from cyclooxygenase inhibition. *Eur J Heart Fail*, v. 9, n. 2, p. 191-196, Feb. 2007.

KANETA, T.; HAKAMATSUKA, T.; YAMADA, T.; TAKASE, K.; SATO, A.; HIGANO, S.; ITO, H.; FUKUDA, H.; TAKAHASHI, S.; YAMADA, S. Atlantoaxial osteoarthritis in rheumatoid arthritis: FDG PET/CT findings. *Clinical Nuclear Medicine*, v. 31, n. 4, p. 209, Apr. 2006.

KANTOR, T. G. Use of diclofenac in analgesia. *Am J Med*, v. 80, p. 64-69, 1986.

KATAYAMA, R.; YAMAGUCHI, N.; YAMASHITA, T.; WATANABE, S.; SATOH, H.; YAMAGISHI, N.; FURUHAMA, K. Calculation of glomerular filtration rate in conscious rats by the use of a bolus injection of iodixanol and a single blood sample. *J Pharmacol Toxicol Methods*, v. 61, n. 1, p. 59-64, Jan./Fev. 2010.

KING, J. C. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am J Clin Nutr*, v. 71, p. 1334-1343, 2000.

KREBS, N. F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr*, n. 130, p. 1374S-1377S, 2000.

KU, E. C., LEE, W. KOTHARI, H. V., SCHOLER, D. W. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med.*, v. 80, n. 4B, p. 18-23, 1986.

KUMMER, C. L; COELHO, T. C. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. *Rev. Bras. Anestesiol*, v. 52, n. 4, p. 498-512, July 2002.

KVIEN, T. K.; UHLIG, T.; ODEGARD, S.; HEIBERG, M. S. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1069, p. 212-222, June 2006.

LAERUM, E.; OMMUNDSEN, O. E.; GRØNSETH, J. E.; CHRISTIANSEN, A.; FAGERTUN, H. E. Intramuscular diclofenac versus intravenous indomethacin in the treatment of acute renal colic. *Eur Urol.*, v. 30, n. 3, p. 358-362, 1996.

LEE, A.; COOPER, M. G.; CRAIG, J. C.; KNIGHT, J. F.; KENEALLY, J. P. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on postoperative renal function in adults with normal renal function. *Cochrane Database Syst Rev.*, v. 18; n. 2, CD002765, Apr. 2007.

LEE, J.; YOO, K. S.; KANG, D. G.; KIM, S. W.; CHOI, K. C. Gentamicin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. *Jpn J Pharmacol.*, v. 85, n. 4, p. 391-398. Apr. 2001.

LIAUW, H.; WALTER, S.; LEE, L. *et al.* Effects of diclofenac on synovial eicosanoid product formation in arthritis patients. *J Clin Pharmacol*, v. 25, p. 455-474, 1985.

LIPSKI, P. E. Rheumatoid arthritis. In: KASPER, D. L.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S. *et al. Harrison's principles of internal medicine*. 14th ed. New York: McGraw Hill, 1998.

LODER, E. Menstrual migraine: clinical considerations in light of revised diagnostic criteria. *Neurol Sci*, v. 26, p. S121-S124, 2005.

LODER, E.; RIZZOLI, P.; GOLUB, J. Hormonal management of migraine associated with menses and the menopause: a clinical review. *Headache*, v. 47, n. 2, p. 329-340, Feb. 2007.

LUTHMAN, J.; KAY, N. H.; WHITE, J. B. The morphine sparing effect of diclofenac sodium following cesarean section under spinal anesthesia. *Int J Obstet Anesth*, v. 3, p. 82-86, 1994.

LUZ, T. C. B. *Fatores associados ao uso de antiinflamatórios não esteroidais em população de funcionários de uma universidade do Rio de Janeiro*. 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2003.

McCARTHY, D. Nonsteroidal Anti-inflammatory drug-related gastrointestinal toxicity: definitions and epidemiology. *Am. J. Med.*, v. 105, suppl. 5A, p. 3s-9s, 1998.

MacGREGOR, E. A. *et al.* Predicting menstrual migraine with a home-use fertility monitor. *Neurology*, v. 64, p. 561-563, 2005.

MACHADO, C.; RUPERTO, N. Consenso em reumatologia pediátrica: parte I: definição dos critérios de doença inativa e remissão em artrite idiopática juvenil/artrite reumatóide juvenil. *Rev Bras Reumatol*, v. 45, n. 1, p. 9-13, jan./fev., 2005.

MACHADO, R. R. *Mediadores envolvidos na resposta febril induzida pela RANTES*. 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MACIÁ, M. A., FRIAS, J., CARCAS, A. J., GUERRA, P., VALIENTE, R., LUTERO, M. L. Comparative bioavailability of a dispersible formulation of diclofenac sodium. *Curr Therap Res.*, v. 37, p. 435-439, 1995.

McNEELY, W.; GOA, K. L. Diclofenac-potassium in migraine: a review. *Drugs*, v. 57, p. 991-1003, June 1999.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. The importance of zinc in human nutrition. *Rev. Nutr.*, v. 17, n. 1, Campinas, jan./mar. 2004.

MARTIN, P.; MEDEIROS, A. C.; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C. O papel dos inibidores do fator de necrose tumoral no tratamento da artrite idiopática juvenil. *Rev Bras Reumatol*, v. 46, n. 2, p. 126-133, mar./abr. 2006.

MARTINS, J. M. *Avaliação da atividade antipirética do diclofenaco de sódio*. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MARX, F. C.; OLIVEIRA, L. M.; BELLINI, C.; RIBEIRO, M. C. C. Tradução e validação cultural do questionário algofuncional de lequesne para osteoartrite de joelhos e quadris para a língua portuguesa. *Rev Bras Reumatol*, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), v. 46, n. 4, p. 253-260, jul./ago., 2006.

MARZO, A.; DAL BO, L.; VERGA, F.; MONTI, N. C.; ABBONDATI, G.; TETTAMANTI, R. A.; CRIVELLI, F.; UHR, M. R.; ISMAILI, S. Pharmacokinetics of diclofenac after oral administration of its potassium salt in sachet and tablets formulation. *Arzneimittelforschung*, v. 50, p. 43-47, 2000.

MAWANDA, M.; SSENKUSU, J. M.; ODIIT, A.; KIGULI, S.; MUYINGO, A.; NDUGWA, C. Micro-albuminuria in Ugandan children with sickle cell anaemia: a cross-sectional study. *Ann Trop Paediatr*, v. 31, n. 2, p. 115-121, 2011.

MENASSÉ, R.; HEDWALL, P. R.; KRAETZ, J.; PERICIN, C.; RIESTERER, L.; SALLMANN, A.; ZIEL, R.; JAQUES, R. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand. J. Rheumatol Suppl.*, n. 22, p. 5-16, 1978.

MENDES, G. B. B., FRANCO, L. M., MORENO, R. A., FERNANDES, A. G., MUSCARA, M. N., DE NUCCI, G. Comparative bioavailability of two suspension formulations of potassium diclofenac in healthy male volunteers. *Int. Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 82, n. 3, p. 131-135, 1994.

MORALES, A. I.; BUITRAGO, J. M.; SANTIAGO, J. M.; FERNÁNDEZ-TAGARRO, M.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; PÉREZ-BARRIOCANAL, F. Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antioxid Redox Signal*, v. 4, n. 6, p. 893-898, Dec. 2002.

MOSEGUI, B. G.; ROZENFELD, S.; VERAS, R. P.; VIANNA, C. M. M. Avaliação da qualidade do uso de medicamentos em idosos: quality assessment of drug use in the elderly. *Rev. Saúde Pública*, v. 33, n. 5, p. 437-444, out. 1999.

MÜLLER, C. R.; HAAS, S. E.; BASSANI, V. L.; GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; PERALBA, M. C. R.; POHLMANN, A. R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Quim. Nova*, v. 27, n. 4, p. 555-560, 2004.

MÜLLER, S. S.; CURCELLI, E. C.; SARDENBERG, T.; ZUCCON, A.; CRUDIS JÚNIOR, J. L.; PADOVANI, C. R. Clinical and biomechanical analysis of the effect of diclofenac sodium in tibial fracture healing in rats. *Acta Ortop Bras*, v. 12, n. 4, Oct./Dec. 2004.

MUNGER, M. A.; GARDNER, S. F.; ATESHKADI, A.; RABETOY, .G. M.; BARRI, Y. M.; STODDARD, G. J.; CHEUNG, A. K.; MEDIC STUDY INVESTIGATORS. Misoprostol effects on diclofenac-induced cardiorenal changes in salt-sensitive patients with hypertension: the MEDIC study. *Pharmacotherapy*, v. 28, n. 7, p. 834-842, July 2008.

NAKAEMA, N. M. K.; FRACASSO, J. F.; LONGO, M. C.; SIQUEIRA, C. E.; GODÓI, P. H. B.; RODRIGUES, L. A. Efeito do tratamento com algumas vitaminas B na potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da talidomida. *Revista de Ciências Farmacêuticas Aplicada*, v. 26, n. 3, 2005.

OSTENSEN, M.; HUSBY, G. Antirheumatic drug treatment during pregnancy and lactation. *Scand J Rheumatol Suppl*, v. 14, p. 1-7, 1985.

PACHECO, L. F. *Função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina sob a infusão de angiotensina (1-7)*. 2009. Tese (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

PATEL MANALI, B.; DESHPANDE, S.; SHAH, G. Evaluation of efficacy of vitamin E and N-acetyl cysteine in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail.*, v. 33, n. 3, p. 341-347, 2011.

PATIL, C. R.; JADHAV, R. B.; SINGH, P. K.; MUNDADA, S.; PATIL, P. R. Protective effect of oleanolic acid on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Phytother Res.*, v. 24, n. 1, p. 33-37, Jan. 2010.

PEIXOTO, M. R. G.; MONEGO, E. T.; JARDIM, P. C. B. V.; CARVALHO, M. M.; SOUSA, A. L. L.; OLIVEIRA, J. S.; BALESTRA NETO, O. Dieta e medicamentos no tratamento da hiperuricemia em pacientes hipertensos. *Arq Bras Cardiol*, v. 76, n. 6, p. 463-467, 2001.

PELOSO, P. M. Strategies and practice for use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol*, v. 105, p. 29-48, 1996.

PEREIRA, H. L. A.; RIBEIRO, S. L. E.; CICONELLI, R. M. Tratamento com antiinflamatórios tópicos na osteoartrite de joelho. *Rev Bras Reumatol*, v. 46, n.3, p. 188-193, maio/jun. 2006.

PERSON, O. C.; BOTTI, A. S.; FÉRES, M. C. L. C. Clinical repercussions of zinc deficiency in human beings. *Arq Med ABC*, v. 31, n. 1, p. 46-52, 2006

PERTTUNEN, K.; KALSO, E.; HEINONEN, J.; SALO, J. IV diclofenac in post-thoracotomy pain. *BJA*, v. 68, n. 5, p. 474-480, Nov. 1992.

REINER, V.; REINER, A.; REINER, G.; CONTI, M. Increased absorption rate of diclofenac from fast acting formulations containing its potassium salt. *Arzneimittelforschung*, v. 51, n. 11, p. 885-890, 2001.

ROCKEMANN, M. G.; SEELING, W.; BISCHOF, C.; BÖRSTINGHAUS, D.; STEFFEN, P.; GEORGIEFF, M. Prophylactic use of epidural mepivacaine/morphine, systemic diclofenac, and metamizole reduces postoperative morphine consumption after major abdominal surgery. *Anesthesiology*, v. 84, n. 5, p. 1027-1034, May 1996.

RODRIGUES, L. A.; FRACASSO, J. F.; SIQUEIRA, C. E. Potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da nimesulida por vitaminas do complexo B. *Revista de Ciências Farmacêuticas Aplicada*, v. 28, n. 1, 2007.

RODRIGUES DE LA SERNA, A.; DIAZ-RUBIO, M. Multicenter clinical trial of zinc acexamate in the prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug induced gastroenteropathy. *J. Rheumatol.*, v. 21, p. 927-933, 1994.

ROSA, P. C. S.; PEIRÓ, J. R.; CAMPEBELL, R. C.; VALADÃO, C. A. A.; BECHARA, G. H. Efeitos do diclofenaco e da dexametasona na endotoxemia experimental em eqüinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 3, p. 279-286, jun. 2003.

ROSE, B. D. *NSAIDs: acute renal failure and nephrotic syndrome*. 2010. Disponível em: <<http://www.uptodateonline.com/online/content/search.do>>.

ROSSI, E. Avaliação clínica do diclofenaco sódico de liberação gradativa no tratamento da artrite reumatóide: clinical evaluation of slow-release sodium diclofenac in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arq. bras. med.*, v. 60, n. 6, p. 521-526, nov./dez. 1986.

SAFA, J.; ARGANI, H.; BASTANI, B.; NEZAMI, N.; RAHIMI ARDEBILI, B.; GHORBANIHAGHJO, A.; KALAGHEICHI, H.; AMIRFIROUZI, A.; MESGARI, M.; SOLEIMANY RAD, J. Protective effect of grape seed extract on gentamicin-induced acute kidney injury. *Iran J Kidney Dis.*, v. 4, n. 4, p. 285-291, Oct. 2010.

SAKAGUCHI, S.; SACAGUCHI, N. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol*, v. 17, n. 6, p. 589-594, Dec. 2005.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A. SARABIA, M. I.; CARO, R.; DE PAOLI, T.; HAGER, A.; WEIL, R.; BOCCIO, J. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr Res*, v. 20, p. 737-755, 2000.

SALLMANN, A. R. The history of diclofenac. *Am. J. Med.*, v. 80, n. 4B, p. 29-33, Apr. 1986.

SANDSTEAD, H. H. Understanding zinc: recent observations and interpretations. *J Lab Clin Med*, v. 124, n. 3, p. 322-327, 1994.

SANTOS, L. H. *Avaliação das atividades antiinflamatórias, antinociceptiva e da incidência de lesão gástrica do complexo diclofenaco-zinco em ratos*. 2001. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

SANTOS, L. H.; FERES, C. A.; MELO, F. H.; COELHO, M. M.; NOTHENBERG, M. S.; OGA, S.; TAGLIATI, C. A. Anti-inflammatory, antinociceptive and ulcerogenic activity of a zinc-diclofenac complex in rats. *Braz J Med Biol Res.*, v. 37, n. 8, p. 1205-1213, Aug. 2004.

SCHOLER, D. W.; KU, E. C.; BOETTCHER, I.; SCHWEIZER, A. Pharmacology of diclofenac sodium. *Am J Med.*, v. 80, n. 4B, p. 34-38, Apr. 1986.

SCHUMACKER, H. R. Jr.; BOICE, J. A.; DAIKH, D. I. *et al.* Randomised double blind trial of etoricoxib and indometacin in treatment of acute gouty arthritis. *Brit Med J*, v. 324, 2002.

SECOLI, S. R.; LEBRÃO, M. L. Risco de eventos adversos e uso de medicamentos potencialmente interativos. *Saúde Coletiva*; v. 6, n. 30, p. 113-118, 2009.

SENNÁ, E. R.; BARROS, A. L. P.; SILVA, E. O.; COSTA, I. F.; PEREIRA, L. V. B.; CICONELLI, R. M. *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: A study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*, v. 31, n. 3, p. 594-597, 2004.

SEPPALA, E., NISSILA, M., ISOMAKI, H., NUOTIO, P., NYKANEN, E., LAITINEN, O., VAPAATALO, H. Comparison of the effects of different anti-inflammatory drugs on synovial fluid prostanoid concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.*, v. 4, n. 3, p. 315-320, 1985.

SEYMOUR, R. M.; HENDERSON, B. Pro-inflammatory-anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *IMA J Math Appl Med Biol*, v. 18, n. 2, p. 159-192, June 2001.

SHUTTLEWORTH, V. S. Zinc – in perspective. *The Brith Homoeop J*, v. 75, n. 2, p. 69-74, 1986.

SOUSA, M. S. C. *Oscilações hormonais e cefaleias na mulher*. 2008. Monografia (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2008.

SOUTER, A. J.; FREDMAN, B.; WHITE, P. F. Controversies in the perioperative use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Anesth Analg*, v. 79, n. 6, p. 1178-1190, Dec. 1994.

SUPERVÍA, A.; PEDRO-BOTET, J.; NOGUÉS, X.; ECHARTE, J. L.; MÍNGUEZ, S.; IGLESIAS, M. L.; GELABERT, A. Piroxicam fast-dissolving dosage form vs diclofenac sodium in the treatment of acute renal colic: a double-blind controlled trial. *Br J Urol.*, v. 81, n. 1, p. 27-30, Jan. 1998.

SWEENEY, S. E.; FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 36, n. 3, p. 372-378, Mar. 2004.

TAMBLYN, R.; BERKSON, L.; DAUPHINEE, W. D.; GAYTON, D.; GRAD, R.; HUNAG, A.; ISAAC, L.; McLEOD, P.; SNELL, L. Unnecessary prescribing of NSAIDs and the management of NSAID-related gastropathy in medical practice. *Ann Intern Med*, v. 127, n. 6, p. 429-438, Sept. 1997.

TAMURA, F.; VOGELSANG, G. B.; REITZ, B. A.; BAUMGARTNER, W. A.; HERSKOWITZ, A. Combination thalidomide and cyclosporine for cardiac allograft rejection. *Transplantation*, v. 49, p. 20-25, 1990.

TASMAN-JONES C. Distúrbios no metabolismo de oligoelementos. In: WYNGAARDEN, J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. (Ed.). *Tratado de medicina interna*. 19. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1992, v. 1, p. 1204-1207.

TAYLOR, R. J.; SALATA, J. J. Inhibition of prostaglandin synthetase by tolmetin (Tomectin, McN-2559), a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Biochem Pharmacol.*, v. 25, n. 22, p.2479-2484, 1976.

TODD, P. A.; SORKIN, E. M. Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, v. 35, p. 244-285, 1988.

TOGNINI, J. R. F.; GOLDENBERG, S.; SIMÕES, M. J.; SAUER, L.; MELO, R. L.; ORTIZ, P. L. A. Efeito do diclofenaco de sódio na cicatrização da parede abdominal de ratos. *Acta Cir. Bras.*, v. 13, n. 3, July/Aug./Sept., 1998.

TOGNINI, J. R. F.; GOLDENBERG, S.; SIMÕES, M. J.; SAUER, L.; MELO, R. L.; ORTIZ, P. L. A. Efeito do diclofenaco de sódio na cicatrização da parede abdominal de ratos. *Acta Cir. Bras.*, v. 31, p. 455-461, 1985.

VALORI, F. K. *Avaliação da utilização do diclofenaco sódio isolado ou associado ao carisoprodol, paracetamol e cafeína, como adjuvante no tratamento de disfunções temporomandibulares crônicas*. 2008. 158 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2008.

VANDENBROUCKE, J. P.; HAZEVOET, H. M. Cats a survival and death in rheumatoid arthritis: a 25 year prospective follow up. *J Rheumatol*, v. 11, p. 158-161, 1984.

VANE JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, v. 231, n. 25, p. 232-235, June 1971.

WAHID, M. A.; SAH, F.; ABOUL-KHAIR, M. R. Zinc in human health and disease. *Ric Clin Lab*, v. 18, p. 9-16, 1988.

WALSH, N. C.; CROTTI, T. N.; GOLDRING, S. R.; GRAVALLESE, E. M. Rheumatic diseases : the effects of inflammation on bone. *Imunol Rev*, v. 208, p. 228-251, 2005.

WANNMACHER, L.; BREDEMEIER, M. Antiinflamatórios não-esteróides: uso indiscriminado de inibidores seletivos de ciclooxigenase-2. *Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados*, Brasília, v. 1, n. 2, jan. 2004.

WECK, A. L.; SANZ, M. L.; GAMBOA, P. M.; ABERER, W.; BLANCA, M.; CORREIA, S. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome: a multicenter study. I: clinical findings and in vitro diagnosis. *J Investig Allergol Immunol.*, v. 19, n. 5, p. 355-369, 2009.

WEISS, J. H.; SENSI, S. L.; KOH, J. Y. Zn<sup>2+</sup>: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease, *TIPS*, v. 21, p. 395-401, 2001.

WHELTON, A. Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2 specific inhibitors. *Am J Med*, v. 110, Suppl. 3A, p. 33S-42S, Feb 2001.

WHELTON, A.; LEFKOWITH, J. L.; WEST, C. R.; VERBURG, K. M. Cardiorenal effects of celecoxib as compared with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and ibuprofen. *Kidney Int*, v. 70, n. 8, p. 1495-502, Oct. 2006.

WIESENBERG-BOETTCHER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; SCHWEIZER, A.; SALLMANN, A.; WENK, P. Pharmacological properties of five diclofenac metabolites identified in human plasma. *Agents Actions*, v. 34, n. 1/2, p. 135-137, Sept. 1991.

WILES, N.; SYMMONS, D. P. M.; HARRISON, B.; BARRETT, E.; BARRETT, J. H.; SCOTT, D. G. I.; SILMAN, A. J. Estimating the incidence of rheumatoid arthritis: trying to hit a moving target? *Arthritis Rheum*, v. 42, n. 7, p. 1339-1346, July 1999.

WILLIS, J. V.; KENDALL, M. J.; FLINN, R. M. *et al.* The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 16, p. 405-410, 1979.

YAKSH, T. L.; DIRIG, D. M.; CONWAY, C. M. *et al.* The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E<sub>2</sub> is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci*, v. 21, n. 16, p. 5847-5853, Aug. 2001.

YASMEEN, T.; YASMIN, F.; QURESHI, G. S. To evaluate the role of diclofenac sodium on renal parenchyma of young albino rats. *Pak J Pharm Sci.*, v. 21, n. 2, p. 98-102, Apr. 2008.

ZACARON, K.; DIAS, J. M. D.; ABREU, N. S.; DIAS, R. C. Nível de atividade física, dor e edema e suas relações com a disfunção muscular do joelho de idosos com osteoartrite. *Rev. bras. fisioter.*, São Carlos, v. 10, n. 3, p. 279-284, jul./set. 2006.