

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA,
HEMATOLÓGICA E ESPERMÁTICA DE PÔNEIS
TRATADOS COM MELOXICAM**

TESE DE DOUTORADO

Ricardo Pozzobon

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA, HEMATOLÓGICA E ESPERMÁTICA DE PÔNEIS TRATADOS COM MELOXICAM

por

Ricardo Pozzobon

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

Orientadora: Profa. Mara Iolanda Batistella Rubin
Co-orientadora: Profa Karin Erica Brass

Santa Maria, RS, Brasil
2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA, HEMATOLÓGICA E
ESPERMÁTICA DE PÔNEIS TRATADOS COM MELOXICAM**

elaborada por
Ricardo Pozzobon

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Mara Iolanda Batistella Rubin, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Adriana Pires Neves, Dra. (UNIPAMPA)

Flávio Desessards De La Corte, PhD. (UFSM)

Rodrigo Costa Mattos, Dr. (UFRGS)

Sérgio da Silva Fialho, Dr. (UFSM)

Santa Maria, julho de 2010

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria por toda a minha formação profissional.

A meus pais, Itá e Nilva, pelo apoio durante toda a minha vida. Obrigado pela dignidade e honestidade a mim transmitidas.

À minha querida esposa Rochele, pelo amor incondicional, companheirismo, e pela ajuda para concluir mais uma etapa de minha vida. O auxílio na farmacologia e patologia clínica foi valioso.

À minha irmã Raquel, pela grande ajuda com as traduções e por me incentivar durante toda a vida acadêmica.

À minha orientadora Mara Rubin, pelo apoio e confiança durante toda minha formação.

À minha co-orientadora Karin Brass, pelo aprendizado proporcionado desde o mestrado. Agradeço pela oportunidade e confiança.

Ao professor Flávio De La Corte pela ajuda e oportunidade.

Ao professor Rafael Fighera, um agradecimento especial pelo auxílio durante toda a pós-graduação.

Ao professor Juliano Ferreira pela ajuda nas discussões sobre inflamação e farmacologia, e por proporcionar a análise laboratorial das prostaglandinas.

Ao LAC-HUSM pela gentileza na realização dos exames hematológicos e bioquímicos, especialmente aos Farmacêuticos Eleú e Clóvis.

Aos meus colegas e amigos Daniel Rissi, Juliano Roman, e especialmente a Daniela Sherer pela ajuda no desenvolvimento dos trabalhos durante toda a pós-graduação.

Ao colega e amigo Rogério Ferreira, pela grande ajuda com a análise estatística.

Aos colegas e amigos Diego De Gasperi, Diego Silva, Marcos Azevedo, Eduardo Silveira e estagiários da clínica, pelo apoio e amizade durante os experimentos.

Aos colegas e estagiários do Embryolab pela ajuda nas coletas, análises laboratoriais e amizade.

Aos animais pela colaboração e paciência.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA, HEMATOLÓGICA E ESPERMÁTICA DE PÔNEIS TRATADOS COM MELOXICAM

AUTOR: RICARDO POZZOBON

ORIENTADOR: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN

CO-ORIENTADORA: KARIN ERICA BRASS

Local e data da defesa: Santa Maria, 15 de julho de 2010.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os fármacos mais utilizados na medicina veterinária. A maioria deles produz efeitos colaterais, como úlceras gastrointestinais, lesões renais e hepáticas, por inibirem a ciclooxygenase-1 (COX-1). Com a descoberta da COX-2, passaram a ser desenvolvidos AINEs para inibir seletivamente esta enzima, tida até pouco tempo como inflamatória. Porém, hoje se sabe que a COX-2 não é expressa exclusivamente em condições inflamatórias, mas também em funções fisiológicas em vários tecidos, como o cerebral, reprodutivo feminino e masculino. Vários eqüinos, como garanhões, são freqüentemente tratados com algum AINE, e muitas vezes esses tratamentos são prolongados como nos casos de osteoartrite e laminitide. Além disto, são escassas as informações sobre os efeitos causados tanto pelos AINEs com inibição inespecífica de COX, como pelos ditos seletivos para a COX-2, especialmente sobre o sistema reprodutivo e cardiovascular de eqüinos. O conhecimento da farmacocinética de novos AINEs, como o meloxicam em diferentes condições de saúde e tamanho de eqüinos poderia explicar a sua eficácia ou efeito tóxico diversos. Desta forma, o estudo da farmacocinética do meloxicam oral foi realizado com três grupos distintos de eqüinos com três animais cada. Um grupo formado por pôneis com sinovite induzida, um grupo com pôneis saudáveis e outro grupo com cavalos saudáveis. Todos os animais foram tratados com a dose indicada (0,6 mg/kg via oral). As amostras de sangue para obtenção do plasma foram coletadas antes (tempo 0), 15, 30 minutos e 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-medicação. O tempo da concentração máxima do fármaco (Tmax) foi mais tardio ($P<0,05$) nos cavalos e a concentração plasmática máxima (Cmax) foi maior ($P<0,05$) nos pôneis saudáveis. As primeiras concentrações plasmáticas foram atingidas mais rapidamente ($P<0,05$) nos grupos de pôneis. Para avaliar o efeito do meloxicam (AINE com ação preferencial sobre a COX-2) sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos, na mucosa gástrica, e sobre a qualidade do sêmen eqüino foram utilizados seis garanhões pôneis. Estes foram distribuídos em três grupos, sendo um tratado com meloxicam (0,6 mg/kg via oral), outro com cetoprofeno como controle positivo (2,2 mg/kg via oral; inibidor inespecífico de COX) durante 30 dias e um terceiro grupo não recebeu nenhum tratamento constituindo o grupo controle negativo. O experimento foi repetido três vezes alternando-se os pôneis de grupos num delineamento quadrado latino. Amostras de sangue foram coletadas antes (semana zero), durante (semanas um a quatro) e uma semana após o fim do tratamento (semana cinco) para determinação dos parâmetros hematológicos (hemograma e coagulograma) e

bioquímicos (fosfatase alcalina - AP, aspartato aminotransferase - AST e gama-glutamil transferase - GGT). Também foram realizadas gastroscopias antes (semana zero) e após o final do tratamento (semana cinco). O sêmen foi coletado e avaliado duas vezes por semana antes (semana zero), durante (semanas um a quatro) e por 11 semanas após o final do tratamento (semanas cinco a 15). A concentração de prostaglandinas totais no plasma seminal foi avaliada nas semanas zero a cinco e na semana 15. Os tratamentos não modificaram nenhum parâmetro hematológico, bioquímico e gástrico avaliado, mas o tempo de coleta influenciou o fibrinogênio, tempo de pró-trombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. O grupo tratado com meloxicam apresentou mais ($P<0,05$) espermatozoides com lesões de membrana e com diminuição da funcionalidade da membrana, bem como aumento significativo ($P<0,05$) de defeitos de cauda e diminuição ($P<0,05$) na concentração de prostaglandinas totais no plasma seminal, comparado aos grupos cetoprofeno e controle. Os parâmetros da farmacocinética diferiram entre os pôneis saudáveis e com sinovite. Isto pode ser atribuído a uma possível migração do fármaco para o local da lesão. A absorção do meloxicam foi mais rápida nos pôneis. Os tratamentos não influenciaram os parâmetros hematológicos, de coagulação, bioquímicos e na mucosa gástrica. O tratamento por 30 dias com meloxicam diminui a concentração de prostaglandinas totais no plasma seminal e interfere negativamente na qualidade do sêmen, sugerindo uma ação fisiológica da COX-2 no tecido reprodutivo de garanhões.

Palavras-chave: Cicloxygenase 2, anti-inflamatório não esteroidal, sêmen, garanhões, farmacocinética.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PHARMACOKINETICS, HEMATOLOGICAL AND SPERMATIC PARAMETERS IN PONIES TREATED WITH MELOXICAM

AUTHOR: RICARDO POZZOBON

ADVISER: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN

CO-ADVISER: KARIN ERICA BRASS

Local and date of presentation: Santa Maria, July 15, 2010.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most used drugs in veterinary medicine. Most of the original NSAIDs inhibit primarily cyclooxygenase-1 (COX-1) and cause adverse effects such as gastrointestinal ulcers, kidney and liver damage. When the formerly supposed anti-inflammatory COX-2 enzyme was discovered, NSAIDs were developed to selectively inhibit this enzyme. Today it is known that COX-2 is not exclusively expressed in inflammatory conditions; it also has physiologic functions in tissues such as brain, male and female reproductive tracts. Several horses, such as stallions, are treated with some NSAID, and many times these treatments are prolonged as in osteoarthritis and laminitis. In horses, there is still little information about the effects of COX-1 and COX-2 selective NSAIDs on the reproductive and cardiovascular systems. Pharmacokinetic information of NSAIDs, like meloxicam, in different health conditions and horse breeds may explain differences in efficiency and/or toxicity. This study evaluated meloxicam pharmacokinetics on 3 groups with 3 animals each: a group of ponies with induced synovitis, a group of healthy ponies and a group of healthy horses. All animals were treated with the recommended dosage (0.06 mg/kg, PO) of meloxicam. Plasma was obtained from blood samples collected before (time 0), 15 and 30 minutes, and 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours after medication. The time to reach the maximum plasma concentration (Tmax) was longest ($P<0.05$) in horses and the maximum concentration (Cmax) was highest ($P<0.05$) in healthy ponies. The initial plasma concentrations were achieved more quickly ($P<0.05$) in both ponies groups. In a second study, the effect of meloxicam (preferential COX-2 NSAID) and ketoprofen (unspecific NSAID) was evaluated on hematological and biochemical variables, on the gastric mucosa and on semen quality of 6 healthy pony stallions. The ponies were treated for 30 days and then the experiment was repeated a second time changing the ponies' group in a latin square design. The stallions were distributed equally into 3 groups; one was treated with meloxicam (0.6 mg/kg oral administration, PO; n=6), another with ketoprofen (2.2 mg/kg, PO; n=6, positive control) and the negative control group (n=6) received no treatment. Blood samples were obtained once a week for six weeks, beginning before treatment and extending until 1 week after the treatment ended to evaluate hematologic, coagulation and biochemical (AP, AST and GGT) profiles. Gastroscopic evaluation was determined 1 week before and 1 week after the treatment ended. Semen was collected and evaluated twice a week for 16 weeks: before

treatment began (week 0), during 4 weeks of treatment (weeks 1-4), and 10 weeks after the treatment ended (weeks 5-15). Concentration of total prostaglandins (PGs) was measured in the seminal plasma of ejaculates collected before (week 0), during (1 to 4 weeks) and after treatment (week 5 and week 15). The treatments did not alter any evaluated hematological and biochemical parameter as well as on the gastric mucosa, but there was a time effect on fibrinogen, pro-thrombin time and activated partial thromboplastin time. Meloxicam treatment caused more ($P<0.05$) damage to the sperm membrane integrity and decreased ($P<0.05$) membrane function and total PGs concentration. A significant increase ($P<0.05$) in tail defects also was observed 2 weeks after treatment ended. In summary, pharmacokinetics differed between healthy ponies and those with synovitis. This may be the result of drug migration to the injury site. Meloxicam absorption was faster in ponies. No influence of the treatments was observed on the hematological or biochemical parameters as well as on gastric mucosa. Thirty day long meloxicam treatment lowered PGs in seminal plasma and affected semen quality. This suggests a physiological function of COX-2 in the stallion's reproductive tract.

Key-words: Cyclooxygenase-2, non steroidal anti-inflammatory drugs, semen, stallion, pharmacokinetics

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

TABELA 1 – Parâmetros da farmacocinética do meloxicam no plasma após administração oral na dose de 0,6 mg/kg. Valores são médias ± erro padrão da média (SEM).....	40
--	----

Capítulo 3

TABLE 1 – Seminal parameters from weekly collected ejaculates during 16 weeks in meloxicam or ketoprofen treated and control (none treated) stallions (n=6 each) and effect of treatment, time of semen collection and interactions between treatment and time.....	69
---	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

FIGURA 1 – Concentração plasmática do meloxicam nos diferentes grupos no decorrer do tempo (0-24 horas). Valores são médias \pm SEM. * ($P<0,05$)..... 40

Capítulo 2

FIG. 1. Mean \pm SEM hematological parameters in ponies that received meloxicam or ketoprofen (positive control) for 30 days, or were left untreated (control group) before (week 0), during (weeks 1-4) and after treatment (week 5), ($P>0.05$)..... 53

FIG. 2. Mean \pm SEM biochemical parameters in ponies that received meloxicam or ketoprofen (positive control) for 30 days, or were left untreated (control group) before (week 0), during (weeks 1-4) and after treatment (week 5), ($P>0.05$)..... 54

Capítulo 3

FIG. 1. Means \pm SEM of seminal plasma TPGs concentrations in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1 to 4), one (week 5) and 10 weeks (week 15) after ended treatment. Letter “a” indicates significant difference of meloxicam with others groups..... 69

FIG. 2. Means \pm SEM of non viable sperm (eosin stained) in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1-4) and after (weeks 5-15) ended treatment. Letter "a" indicates significant difference of meloxicam with others groups.....	70
FIG. 3. Means \pm SEM of tail defects sperm in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1-4) and after (weeks 5-15) ended treatment. Letter "a" indicates significant difference of meloxicam with others groups.....	70
FIG. 4. Means \pm SEM of HOS positive sperm in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1-4) and after (weeks 5-15) ended treatment. Letter "a" indicates significant difference of meloxicam with others groups and (*) indicates significant difference of week 0 intra group.....	71
FIG. 5. Means \pm SEM of neck defects sperm in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1-4) and after (weeks 5-15) ended treatment.....	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Cicloxygenase1(COX-1).....	16
2.2. Cicloxygenase 2 (COX-2).....	17
2.3. Funções da COX-1 e da COX-2.....	18
2.3.1. Sistema cardiovascular.....	18
2.3.2. Trato gastrointestinal.....	20
2.3.3. Sistema renal.....	21
2.3.4. Sistema reprodutivo.....	21
2.4. Inibidores de COX-1 e de COX-2 – Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	23
2.4.1. Inibidores seletivos da COX-2.....	24
2.4.2. Meloxicam.....	28
2.4.3. Cetoprofeno.....	29
3. CAPÍTULO 1. Farmacocinética do meloxicam em pôneis com sinovite, e em pôneis e cavalos saudáveis.....	31
4. CAPÍTULO 2. Long term administration of meloxicam and ketoprofen causes no adverse effects on haematological and biochemical parameters, and gastric mucosa of healthy ponies.....	41
5. CAPÍTULO 3. Influence of meloxicam, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, on quality of Pony stallion semen.....	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados na medicina veterinária, por terem ação analgésica, anti-inflamatória, antipirética, antitrombótica e antiendotóxica (MacALLISTER, 1994) e por serem fármacos de fácil acesso e custo relativamente baixo. Estes efeitos estão relacionados com a inibição da araquidono-ciclooxigenase (COX) e, portanto, inibição da produção de prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos. Existem dois tipos de COX que determinam diferentes funções no organismo. A ciclooxigenase 1 (COX-1) que está mais relacionada com funções fisiológicas, enquanto que a ciclooxigenase 2 (COX-2) é expressa principalmente em eventos inflamatórios. Desta forma a COX-1 é dita constitutiva e a COX-2 é mais induzível por algum estímulo ou lesão (BOTTING, 2006).

Na medicina eqüina, os pacientes, como os garanhões, são frequentemente tratados com AINEs, e muitas vezes esses tratamentos são prolongados, como nos casos de osteoartrite e laminite. A maioria dos AINEs utilizados, entre eles o cetoprofeno, são inibidores inespecíficos das COXs, por isso estes fármacos são frequentemente causadores de efeitos tóxicos significativos. As lesões ocorrem principalmente na mucosa do trato gastrointestinal e renal, e também na cartilagem articular. Estes efeitos colaterais aparecem com mais freqüência quando os AINEs são usados em tratamentos prolongados ou em altas doses. Com a introdução no mercado de AINEs com inibição preferencial da COX-2, dos quais o meloxicam foi um dos primeiros, a probabilidade de ocorrerem efeitos colaterais seria menor. Após a descoberta do meloxicam, no final da década de 90, surgiram os AINEs “coxibes”, que são altamente seletivos para COX-2. Porém, a partir de vários estudos, foi comprovado que a COX-2 tem também funções fisiológicas, atuando nos órgãos reprodutivos masculinos e femininos, na homeostase sanguínea e em diversos outros sistemas. Estas informações ainda são muito limitadas, principalmente na espécie eqüina.

O efeito das formulações dos AINEs no organismo, além de suas ações sobre os mediadores químicos, depende de parâmetros relacionados a farmacocinética, como biodisponibilidade, biotransformação e eliminação nas diferentes espécies animais. O

potencial terapêutico e os efeitos colaterais são mediados pelos mesmos processos fisiológicos, ou seja, pela inibição das ciclooxigenases.

Desta forma, foi avaliado o efeito da administração prolongada do meloxicam, o único inibidor preferencial da COX-2 disponível para eqüinos no Brasil, sobre a qualidade espermática e concentração de prostaglandinas no plasma seminal e parâmetros hematológicos e bioquímicos, e a mucosa gástrica de garanhões pôneis, utilizando o cetoprofeno, que é um inibidor inespecífico de COX, como um controle positivo. Através da inibição tanto da COX-1 como da COX-2, relacionar seus efeitos nos sistemas reprodutivo dos garanhões e sanguíneo. Também foi avaliada e comparada a farmacocinética do meloxicam em pôneis saudáveis, com sinovite e em cavalos saudáveis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A ciclooxigenase (COX) ou prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS) é a enzima chave na síntese de prostaglandinas através da hidrólise do seu precursor, o ácido araquidônico. As prostaglandinas são membros da família dos eicosanóides (ácidos graxos oxigenados) e são produzidas por quase todas as células do corpo, exceto pelos eritrócitos. Elas são mediadores lipídicos sintetizados constitutivamente ou em resposta a um trauma celular, estímulo ou por moléculas sinalizadoras e produzem um amplo espectro de efeitos que abrangem praticamente todas as funções biológicas, como mediadores da dor, febre e edema na inflamação (SMITH, 1989; BERENBAUM, 2000; FUNK, 2001).

Na década de 30, dois ginecologistas americanos, Kurzrok e Lieb (1930) observaram que amostras de útero humano se relaxavam ou contraíam quando expostas ao sêmen humano. Mais tarde, foi descrito por Von Euler em 1936 que a presença de uma substância no fluido seminal causava contração da musculatura lisa e diminuía a pressão sanguínea em experimentos com animais. E então, o mesmo pesquisador identificou o princípio ativo como um ácido lipídico solúvel e nomeou-o de prostaglandina, pois parecia ser originado na próstata. Porém, posteriormente, verificou-se que a maioria das prostaglandinas é produzida nas vesículas seminais. Com os avanços na década de 1960 foi demonstrado que as prostaglandinas eram uma família de componentes lipídicos de estrutura original. Mais de 100 substâncias derivadas do ácido araquidônico e sintetizadas por COX têm sido identificadas (BOTTING, 2006).

A prostaglandina E1 (PGE1) e a prostaglandina F 1α (PGF 1α) foram isoladas e suas estruturas identificadas em 1962 (BERGSTRÖM et al., 1962) e em 1964, PGE2 foi sintetizada a partir do ácido araquidônico usando uma preparação de enzimas das vesículas seminais de ovelhas (BERGSTRÖM et al., 1964). As prostaglandinas das séries D, E e F α são as chamadas prostaglandinas primárias sintetizadas de forma gradual por um complexo de enzimas microssomais iniciando com a COX. Desta forma o precursor, ácido araquidônico, é primeiro clivado para formar o derivado endoperóxido, prostaglandina G2

(PGG2), e esta é então reduzida por peroxidase para formar a prostaglandina H2 (PGH2). Esses dois endoperóxidos, que são quimicamente instáveis, são isomerizados enzimaticamente ou não em diferentes produtos, como as PGD2, PGE2 ou PGF2 α (STEINMEYER, 2000).

O endoperóxido, PGH2, é também metabolizado em dois compostos instáveis e altamente ativos com estruturas que diferem daquelas das prostaglandinas primárias. Um destes é o tromboxano A2 (TXA2), formado por uma enzima, tromboxano sintase, isolado de plaquetas (NEEDLEMAN et al., 1976). TXA2 tem uma meia vida muito curta, de aproximadamente 30 segundos, e se decompõe não enzimaticamente em tromboxano B2 (TXB2), estável e relativamente inativo (BOTTING, 1996). A outra rota de metabolismo da PGH2 é para prostaciclina ou prostaglandina I 2 (PGI2), outro composto instável com uma meia vida de aproximadamente 3 minutos, formada pela enzima prostaciclina sintase. A PGI2 é hidrolisada não enzimaticamente para um composto estável muito menos ativo, o 6-keto-PGF1 α (BOTTING, 1996).

A síntese de diferentes prostaglandinas varia de tecido para tecido. Por exemplo, pulmão e baço são hábeis na síntese de um conjunto de produtos, mas outros tecidos não; por isso plaquetas sintetizam TXA2, enquanto que o endotélio dos vasos sanguíneos produz primariamente a PGI2 (BUNTING et al., 1983). A PGE2 é um importante mediador nos rins e na inflamação, enquanto que a PGD2 é produzida nos mastócitos e no cérebro (BOTTING, 1996)

2.1. Cicloxygenase 1

A COX-1, que tem peso molecular de 71 KDa, foi isolada em 1976 de vesículas seminais de ovinos (HEMLER e LANDS, 1976) e foi clonada por três grupos em 1988 (DeWITT e SMITH, 1988; MERLISE et al., 1988; YOKOYAMA et al., 1988). Esta enzima exibe duas atividades, COX e hidroperoxidase, e é derivada de um mRNA de 2,8 Kb. Sua estrutura tri-dimencional consiste de três unidades: um domínio como fator de crescimento epidermal, uma seção de ligação de membrana e um domínio enzimático. Os locais COX e peroxidase são adjacentes, mas espacialmente distintos (PICOT et al., 1994). A enzima interage em somente um folheto da dupla camada lipídica da membrana e assim a

posição dos canais COX permitem ao ácido araquidônico ganhar acesso para ativar o local no interior da camada dupla. O local ativo COX é um longo canal hidrofóbico, e há evidências que alguns AINEs, como o ibuprofeno, inibam a COX-1 pela exclusão de araquidonato da porção superior do canal. Os locais de ligação para o ácido araquidônico e AINEs, tirosina 385 e serina 530, estão posicionados no ápice do local ativo enquanto que o de arginina 120 situa-se fechado para a abertura do canal COX. Ali pode haver outras sub-unidades para ligação do precursor neste canal estreito (MALKOWSKI et al., 2000).

COX-1 é a forma constitutiva das COX, e tem funções claramente fisiológicas. Ela sintetiza prostaglandinas que regulam a atividade normal das células. Sua ativação leva, por exemplo, a produção de prostaciclina que, quando liberada pelo endotélio, é anti-trombótica (MONCADA et al., 1976) e quando liberada pela mucosa gástrica, é muco protetora (WHITTLE et al., 1978). Ela também estimula a COX-1 nas plaquetas a produzir TXA2, causando agregação plaquetária para prevenir um sangramento inapropriado (FUNK et al., 1991). Ou seja, ocorre um equilíbrio entre os prostanoides. A concentração da enzima permanece estável, mas pequenos aumentos na expressão podem ocorrer em resposta à estimulação com hormônios ou fatores de crescimento (DeWITT, 1991; WU et al., 1991).

2.2. Cicloxygenase 2

Em 1972 várias hipóteses sugeriam a existência de uma segunda isoenzima (FLOWER e VANE, 1972; SMITH e LANDS, 1972). Outros (LYSZ e NEEDLEMAN, 1982; LYSZ et al., 1988) também sugeriram duas formas distintas de enzimas COX.

ROSEN et al. (1989) ao estudarem a regulação de COX em cultura de células epiteliais de traquéias de ovelhas, encontraram um aumento de atividade COX durante a cultura celular. Esta elevação não foi acompanhada pelo aumento coordenado na proteína COX de 70KDa, e o aumento correspondente no mRNA de 2,8 kb. Entretanto, eles encontraram um segundo mRNA de 4,0 kb e sugeriram que este era derivado de um gene COX distinto que codificava uma proteína com atividade COX.

Outros pesquisadores (FU et al., 1990; MASFERRER et al., 1990) relataram que o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) aumentou a síntese de prostaglandina em monócitos humanos *in vitro* e em macrófagos peritoneais de ratos *in vivo*. Este aumento, mas não os

níveis basais da enzima, foi inibido por dexametasona e associado com a síntese de nova proteína COX. Este avanço dava razão ao conceito de formas “COX constitutiva” e “COX induzível”.

Com o avanço das pesquisas novas provas que confirmavam a segunda forma de COX foram surgindo. Pesquisadores descobriram um gene que dava origem a uma segunda forma de COX induzida em fibroblastos de embriões de galinha (SIMMONS et al., 1989; XIE et al., 1991). Ela era codificada por um mRNA de 4,1 kb, de tamanho similar ao descrito por ROSEN et al. (1989). Através de clonagem deduziram que a estrutura da enzima era homóloga à outra forma COX. KUJUBU et al., 1991, encontraram um gene similar em ratos. Outros também confirmaram uma isoforma distinta de COX, a COX-2 (O'BANION et al., 1991; SIROIS e RICHARDS, 1992).

Ambas, COX-1 e COX-2, tem um peso molecular de 71 kDa e a seqüência de aminoácidos mostra uma homologia de 60% com a seqüência da enzima não induzível. O mRNA da enzima induzível é de aproximadamente 4,5 kb e da enzima constitutiva é de 2,8 kb. Os níveis de COX-2, normalmente muito baixos em células, são controlados por vários fatores incluindo citocinas, mensageiros intracelulares e pela disponibilidade de substrato. Assim, o aumento na síntese de prostaglandina é ativado na inflamação devido ao aumento na regulação de COX-2 por estímulos inflamatórios (BOTTING, 2006).

A estrutura tri-dimensional da COX-2 é muito parecida com a estrutura da COX-1, exceto que o local ativo da COX-2 é levemente maior e pode acomodar estruturas maiores do que o local ativo da COX-1 (LUONG et al., 1996).

2.3. Funções da COX-1 e da COX-2

2.3.1. Sistema cardiovascular

Plaquetas sanguíneas expressam somente COX-1, que converte ácido araquidônico no eicosanóide TXA₂, um potente agregador e vasoconstritor, e o principal produto da COX formado pelas plaquetas. TXA₂ tem uma meia vida em pH e temperatura corporal de 30 segundos, degradando-se para uma forma inativa, o TXB₂ (NEEDLEMAN et al., 1976). A prostaciclina é gerada no endotélio vascular e pode ser o antagonista fisiológico deste sistema nas plaquetas. O endotélio vascular normal e células do músculo liso expressam

COX-1 que produz principalmente prostaciclina (PGI₂). Assim, a prostaciclina e o TXA₂ representam, biologicamente, efeitos opostos do mecanismo de regulação da interação parede vascular-plaquetas e formação do botão hemostático e trombo intra-vascular (MONCADA e VANE, 1982). Através da estimulação de receptores, a prostaciclina inibe a agregação de plaquetas e relaxa a musculatura vascular resultando em vasodilatação. Ambos os efeitos são alcançados através da ativação de uma proteína, estimulação de adenilato ciclase e acúmulo de AMP cíclico (OLIVA e NICOSIA, 1987). A prostaciclina inibe a agregação plaquetária (interação plaqueta-plaqueta) em doses menores do que as necessárias para inibir adesão (interação plaqueta-colágeno). Assim, a prostaciclina pode permitir que as plaquetas interajam com o tecido vascular danificado, permitindo a participação das plaquetas na reparação da parede de um vaso, e ao mesmo tempo, impedir ou limitar a formação de trombos (HIGGS et al., 1978).

Estudos de imunohistoquímica sugerem que a expressão de COX-2 em vasos sanguíneos normais é muito baixa (CROFFORD et al., 1994; SCHONBECK et al., 1999). Estudos em humanos recebendo inibidores seletivos para COX-2 mostram, através da estimativa do metabólito da prostaciclina (2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}) na urina, que a maior parte da prostaciclina produzida pelo endotélio deriva da indução de COX-2 (CATELLA-LAWSON et al., 1999; McADAM et al., 1999). No entanto, altos níveis de COX-2 podem ser detectados em tecidos inflamados, microvasos com angiogênese e placas arterio-escleróticas (SANO et al., 1992).

A hemostasia primária é mediada pela interação entre endotélio vascular e plaquetas. Plaquetas expressam COX-1, mas não expressam COX-2 (Lemke et al., 2002). A inibição da atividade da COX-1 por AINEs não seletivos diminui a formação de TXA₂ e desta forma pode reduzir a agregação plaquetária ou causar inibição primária da coagulação. AINEs com alta afinidade por COX-2 não tem efeito relevante na produção de TX ou na agregação plaquetária (Jones & Budsberg, 2000). Em alguns estudos, efeitos colaterais no sistema cardiovascular são relatados em pacientes tratados com AINEs seletivos, incluindo infarto do miocárdio. A hipótese é que os inibidores seletivos previnam a síntese de uma prostaglandina anti-trombótica, a prostaciclina (PGI₂), sintetizada por células endoteliais, preservando o efeito pró-agregador de plaquetas e vasoconstritor de TXA₂. Isso resultaria em um desequilíbrio no sistema de agregação plaquetária em favor da

formação de trombos e vasoconstricção (Bennett et al., 2005; Nussmeier et al., 2005). Este balanço de TXA2/PGI2 é crucial para manutenção da hemostasia.

2.3.2. Trato gastrointestinal

Em muitas espécies, incluindo os seres humanos, as prostaglandinas gastroprotetoras são sintetizadas pela COX-1, embora pequenas quantidades de COX-2 também possam ser expressas constitutivamente no estômago de ratos normais (KARGMAN et al., 1996). O chamado efeito citoprotetor das prostaglandinas na prevenção de erosões gástricas e ulcerações ocorre, principalmente, por via endógena, pela produção de prostaciclina e PGE2. Sua síntese ocorre em cada parte do trato gastrointestinal com maiores concentrações sendo produzidas no músculo liso da parede gástrica e na mucosa gástrica (WHITTLE e SALMON, 1983). Este efeito citoprotetor da mucosa gástrica é complexo, mas depende da redução da secreção do ácido gástrico (ROBERT et al., 1967), aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (WHITTLE et al., 1978) aumento da secreção de muco (JOHANSSON e KOLLBBERG, 1979) e bicarbonato duodenal que neutraliza a produção de ácido do estomago (ALLEN e GARNER, 1980). Surpreendentemente, ratos transgênicos com um gene COX-1 deletado não desenvolvem úlceras espontaneamente (LANGENBACH et al., 1995). A razão para este achado inesperado tornou-se clara quando os ratos foram tratados com uma combinação de um inibidor seletivo COX-1 e um inibidor seletivo COX-2 e rapidamente desenvolveram lesão gástrica (WALLACE et al., 2000). Assim, a inativação de ambas, COX-1 e COX-2, resulta no desenvolvimento de dano gastrointestinal, mas a inibição da atividade de uma enzima apenas, não (GRETZER et al., 2001). Este resultado foi confirmado em ratos transgênicos deficientes do gene COX-1, em que inibição seletiva da COX-2 causou pequenas úlceras no intestino delgado (SIGTHORSSON et al., 2002). Assim, a variação de dano intestinal espontâneo em ratos nocaute para COX-1 pode ser explicado pelo aumento na expressão protéica de COX-2 quando COX-1 está ausente (TANAKA et al., 2002).

Embora em quantidades muito pequenas, a COX-2 é encontrada em tecido intestinal sadio. A expressão de COX-2 é alta em células de câncer de cólon animal e humano bem como em adenocarcinoma colorectal humano (THUN et al., 1991; LUK, 1996). O tratamento com celecoxibe em pacientes com pólipo adenomatoso familiar mostrou uma

redução de 30% nos pólipos intestinais (STEINBACH et al., 2000) e esta indicação do fármaco tem sido sugerida pela FDA (Food and Drug Administration). Tumores gástricos e de mama, no homem, também expressam maiores níveis de proteína COX-2 que os tecidos normais adjacentes (PARRETT et al., 1997).

2.3.3. Sistema renal

O córtex sadio do rim produz principalmente PGE2 e prostaciclina bem como pequenas quantidades de TXA2 (FARMAN et al., 1987) enquanto que a medula renal produz PGE2 (Zusman e Keiser, 1977). PGE2 renal é sintetizada principalmente pela COX-1. Entretanto as células mesangiais na mácula densa contém COX-2 constitutiva que sintetiza prostaciclina. Esta pode estimular diretamente a secreção de renina (HARRIS et al., 1994; HARRIS, 1996).

A produção de prostaglandinas não é essencial para a manutenção da função normal dos rins. Entretanto, as prostaglandinas vasodilatadoras são importantes em pacientes com rins comprometidos por doenças, como, por exemplo, doença cardíaca congestiva, cirrose hepática ou insuficiência renal e em modelos animais de doença. A inibição de COX por AINEs pode resultar em isquemia renal quando a síntese de prostaglandinas é reduzida (BOTTING, 2006).

2.3.4. Sistema reprodutivo

Tanto a COX-1 como a COX-2 são expressas no útero prenhe, membranas fetais e cordão umbilical. Ocorre um aumento de RNAm de COX-2 no âmnion e placenta imediatamente antes e após o início do parto (GIBB e SUN, 1996) que pode ser retardado pela administração de inibidores seletivos para COX-2 (SAWDY et al., 1997). Ratas nocaute de COX-2 são mais inférteis, produzindo proles menores devido a uma redução na ovulação (LIM et al., 1997). Além disso, os rins destes ratos não se desenvolvem completamente após o nascimento, o que reduz sua expectativa de vida para 8 a 16 semanas (DINCHUK et al., 1995; MORHAM et al., 1995). A maturação dos rins também terminou prematuramente quando ratos normais receberam, de forma crônica, inibidores COX-2 durante a gestação (KÖMHOFF et al., 2000). Entretanto, camundongos de uma

linhagem mista não apresentaram essa grave patologia renal (LAULEDERKIND et al., 2002).

O epitélio uterino de ratas é a principal fonte de prostaglandinas durante o parto, e ratas nocaute para COX-1 apresentaram problema no trabalho de parto (REESE et al., 2000) revertida pela administração de prostaglandinas. Prostaglandinas sintetizadas pela COX-1 são também essenciais para a sobrevivência dos fetos durante o parto, pois a maioria dos filhotes de ratas nocaute para COX-1 não sobrevivem (LANGENBACH et al., 1995). Esta alta mortalidade dos filhotes pode ser devida à falha no fechamento do ducto arterioso durante o nascimento. A manutenção do ducto arterioso bem como seu fechamento é dependente de prostaglandinas originadas da COX-1 e da COX-2, pois a prole com duplo nocaute de COX-1 e 2 morre logo após o nascimento com o ducto aberto (REESE et al., 2000; LOFTIN et al., 2001).

A PGE₂ causa contração da musculatura lisa do oviduto eqüino (TROEDSSON et al., 1995). Estes resultados são semelhantes a outros com respeito ao controle da musculatura lisa do oviduto, sugerindo que o transporte seletivo do embrião é mediado pela PGE (WEBER et al., 1991). Baseado nesses estudos e em outras espécies, a PGE parece exercer um efeito seletivo na camada longitudinal da musculatura do oviduto (RODRIGUEZ-MARTINEZ & EINARSSON, 1985). Um mecanismo similar na junção entre útero e oviduto poderia facilitar o transporte de espermatozóides dentro do oviduto. A junção útero tubária é a principal barreira espermática, e pode servir como um reservatório adicional de espermatozóides na égua (SCOTT, 2000). TROEDSSON et al. (2005) sugerem que a PGE possa facilitar o transporte de espermatozóides através da junção útero tubária, embora para confirmar isto sejam necessários experimentos com maior número de repetições. A adição exógena de PGE no sêmen aumentou a fertilidade em equinos (WOODS et al., 2000) e humanos (BROWN et al., 2001). Entretanto, BRINSKO et al. (2003) não observou aumento na proporção de prenhez em éguas quando PGE foi administrada na papila útero tubária 2 horas antes da inseminação.

Muitos estudos foram realizados para demonstrar o papel dos componentes do plasma seminal no transporte e eliminação de espermatozóides do trato reprodutivo feminino. Os resultados confirmam que o plasma seminal tem um importante papel na sobrevivência de espermatozóides viáveis no trato reprodutivo da fêmea, e também na

eliminação de espermatozóides inviáveis do útero. Além disso, o plasma seminal também atua no transporte de espermatozóides no trato reprodutivo de éguas (TROEDSSON et al., 2005).

2.4. Inibidores de COX-1 e de COX-2 – Medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

O AINE mais antigo é o ácido acetilsalicílico (aspirina), um derivado do salicilato originalmente obtido de plantas que foi isolado por Cahours em 1844. Suas principais ações terapêuticas são analgésica, antipirética e anti-inflamatória e seus principais efeitos colaterais são toxicidade gástrica, efeito antitrombótico e atraso do trabalho de parto. A aspirina foi sintetizada por Felix Hoffman da Empresa Bayer na Alemanha em 1897, mas seu mecanismo de ação permaneceu desconhecido até 1971 (BOTTING, 2006). Neste ano VANE, 1971 comprovou a inibição das prostaglandinas pela aspirina e indometacina. O efeito ocorre através da inibição do sistema de enzimas que convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos (MAY & LEES, 1996). Outros pesquisadores do mesmo laboratório (FERREIRA et al., 1971; SMITH & WILLIS, 1971) também identificaram o mesmo mecanismo de ação. Todas as células, incluindo condrócitos e sinoviócitos, possuem ácido araquidônico que é um ácido graxo constituinte da membrana de fosfolipídios (FURST & HILLSON, 2001). Uma vez liberado, o ácido araquidônico é oxidado pela ciclooxygenase ou 5-lipoxigenase (CRYER & FELDMAN, 1992). A oxidação pela ciclooxygenase leva a produção de prostaglandinas (PGs), enquanto a oxidação pela lipoxigenase leva a formação de leucotrienos (FURST e HILLSON, 2001). O efeito primário dos AINEs é da inibição da ciclooxygenase (COX), que bloqueia a conversão do ácido araquidônico para prostaglandinas (HIGGINS e LEES, 1984). Desde então, os AINEs são os medicamentos mais utilizados por sua ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória (JOHNSON & DAY, 1991).

Após a elucidação do mecanismo de ação da aspirina, muitos outros AINEs foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica como o naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, diclofenaco e muitos outros. Eles previnem a superprodução patológica de prostaglandinas pela COX-2 que contribui para o processo inflamatório (efeito terapêutico) e previnem a

formação de prostanóides fisiológicos pela COX-1 (efeitos colaterais). Por exemplo, a atividade ulcerogênica da aspirina surge da inibição de prostaglandinas produzidas no estomago que tem um importante papel citoprotetor da mucosa gástrica. A inibição pela aspirina é devido à acetilação irreversível da serina 530 no site ativo da COX-1 ou da serina 516 no sitio ativo da COX-2 (VAN der OUDERAA et al., 1980). Em contraste a este efeito irreversível da aspirina, outros AINEs como indometacina ou ibuprofeno produzem inibição reversível da COX através da competição com o substrato, ácido araquidônico, para ligação no site ativo da COX-1 ou COX-2 (VANE et al., 1990). A ação antitrombótica é revertida quando o AINE é eliminado, mas permanece irreversível até novas plaquetas serem formadas após 8-10 dias (VANE et al., 1998).

Em muitas espécies, os efeitos tóxicos dos AINEs, em particular a ulceração gástrica, são bem conhecidos. Interessantemente, a toxicidade em eqüinos parece relativamente incomum, desde que o fármaco seja administrado na dose clínica recomendada (LEES e HIGGINS, 1985). O flunixim meglumine retardou a recuperação da mucosa em lesões isquêmicas de jejuno, enquanto que o firocoxibe, que é seletivo para COX-2 não (COOK et al., 2009). Atualmente, com a identificação da COX-1 e COX-2, suas diferentes ações em processos fisiológicos, e os efeitos altamente varáveis dos AINEs, ocorreu uma evolução para produção de AINEs mais seguros. AINEs também podem ser prejudiciais para síntese de proteoglicanos (BELUCHE et al., 2001). Pesquisas com vários AINEs documentaram a inibição da síntese de proteoglicanos em alguns laboratórios, mas não em outros. Variáveis que parecem afetar a supressão são particularidades dos AINEs, como a dose e estado da doença articular (PALMOSKI & BRANDT, 1983).

2.4.1. Inibidores seletivos da COX-2

Segundo a FDA, a indústria dos antiinflamatórios somente nos Estados Unidos movimenta bilhões de dólares. Entretanto, todos os AINEs nas doses antiinflamatórias causam efeitos colaterais, com os mais graves sendo irritação, sangramento e úlceras do trato gastrointestinal. Outro dado importante, é que também nos Estado Unidos, em torno de 100.000 pacientes são internados devido a perfurações, úlceras ou sangramento no estômago, e até 20% desses pacientes necessitam cuidados intensivos (FRIES, 1999).

Desde 1979 se sabe que os AINEs, quando administrados em excesso, podem causar grave ulceração na mucosa glandular de eqüinos, especialmente na região pilórica (MURRAY, 1996). A administração destes antiinflamatórios pode iniciar ou exacerbar ulceração gastrointestinal (MURRAY, 1996), sendo que a fenilbutazona, em cavalos, tem um potencial ulcerogênico gástrico, maior que o flunixin meglumine seguido do ketoprofeno (MacALLISTER, 1993). Toxicidade gatointestinal, renal ou hepática e coagulação demorada, são fatores importantes e mais comumente relacionados com a administração crônica de AINEs em eqüinos. Outro fator importante a considerar é que AINEs alteram a função plaquetária e produzem discrasias sanguíneas em cavalos doentes ou naqueles com hemorragia. A toxicidade é mais comum em cavalos jovens ou velhos, desidratados, imunodeficientes ou ainda em cavalos com doença cardiovascular, renal ou hepática (MUIR, 2004).

Os AINEs tradicionais, na espécie canina, aumentam em 3,5% o risco de erosões e hemorragia submucosa gastrointestinal que podem resultar em anemia crônica e morte. Esses fármacos não devem ser prescritos em pacientes idosos ou com problemas múltiplos de saúde com alteração dos mecanismos hemostáticos, já que a probabilidade de sofrer efeitos adversos por AINEs é maior. Caso sejam usados nestes pacientes estes devem ser cuidadosamente monitorados (ALLYN & JOHNSTON, 1998). Alterações hepáticas foram relatadas após a utilização de AINEs em cães incluindo elevação das enzimas hepáticas com ou sem evidência clínica de disfunção hepática (FOX & CAMPBELL, 2000). O meloxicam, mesmo inibindo mais a COX-2, induziu efeitos deletérios no trato gastrintestinal e células sanguíneas de cães, quando a dose administrada foi cinco e 10 vezes a dose recomendada, demonstrando sua estreita margem de segurança (ALENCAR, 2003).

Estudos levaram a descoberta de duas formas de ciclooxygenase, uma constitutiva, a COX-1, e uma induzida, a COX-2 (MEADE et al., 1993) demonstrando a diferença na farmacologia das duas enzimas (MITCHELL et al., 1993). A COX-1 (chamada de enzima “housekeeping”) é responsável pela produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de processos normais das células, como manutenção das funções gástrica e renal, homeostase vascular, e coordenação da ação de hormônios circulantes (MEADE et al., 1993). A enzima COX-2 pode ser primariamente responsável por respostas inflamatórias

(MEADE et al., 1993). Isso poderia explicar, em parte, a variabilidade na eficácia, bem como na toxicidade, de diferentes AINEs. Vários AINEs, como a aspirina, indometacina e piroxicam, tem se mostrado inibidores mais potentes de COX-1 do que COX-2, sugerindo mais efeitos negativos nos processos fisiológicos do que efeitos benéficos sobre a inflamação (MAY e LEES, 1996). Alguns AINEs inibem igualmente COX-1 e COX-2, enquanto outros parecem inibir mais COX-2 do que COX-1. Os inibidores potentes da COX-1 como a aspirina, indometacina e piroxicam são os AINEs que causam os maiores danos no estômago (LANZA, 1989).

A atividade dos AINEs contra COX-1 quando comparados com os contra COX-2 explica a variação de efeitos locais em suas doses antiinflamatórias. Fármacos altamente inibidores de COX-2 e com baixa relação na atividade COX-2/COX-1 terão potente atividade antiinflamatória com poucos efeitos colaterais sobre estômago e rins. Alguns dados epidemiológicos comprovaram efeitos locais do piroxicam e indometacina, que em doses antiinflamatórias causaram toxicidade gastrointestinal (GARCIA RODRIGUEZ & JICK, 1994). Estes fármacos apresentam maior atividade contra COX-1 que contra COX-2 (VANE & BOTTING, 1995).

Em 1980 foram identificados a nimesulida, etodolaco e meloxicam como medicamentos antiinflamatórios potentes com baixa atividade ulcerogênica no estômago de ratos. Após a caracterização do gene COX-2, estes três fármacos inibem preferencialmente a COX-2 em vez da COX-1, com uma variação na sua razão COX-2/COX-1 entre 0,1 e 0,01 dependendo do sistema de teste utilizado (PATRIGNANI et al., 1994). A seletividade da COX-2 tem sido avaliada principalmente em ensaios *in vitro*, em virtude da simplicidade e rapidez destes testes. A avaliação clínica da especificidade destes compostos se baseia no emprego de técnicas que permitem observar a toxicidade clínica, ou efeitos terapêuticos de doses antiinflamatórias do agente. É importante considerar, entretanto, que diversos fatores determinam a resposta clínica de um inibidor específico da COX-2, incluindo a variabilidade genética da proteína alvo ou de enzimas metabolizadoras, a interação entre drogas e as características do paciente, que podem influenciar, tanto a eficácia como os efeitos adversos, durante o ensaio clínico (FITZGERALD & PATRONO, 2001; CRYER & DUBOIS, 1998).

Inibidores seletivos da COX-2, os chamados “coxibes”, foram introduzidos em 1999. Os primeiros AINEs seletivos para COX-2 foram o celecoxibe e rofecoxibe. No lugar do grupo carboxil do ácido não esteroidal, a estrutura do celecoxibe contém um grupo sulfonamida e o rofecoxibe contém uma metilsulfona. Os anéis fenil contendo enxofre destas drogas se ligam em um local do canal catalítico da COX-2, mas interagem fracamente com o local ativo da COX-1 (KURUMBAIL et al., 1996). Assim, eles são inibidores potentes da COX-2 e inibidores fracos da COX-1. Quando a seletividade é estimada por meio de um teste com sangue humano, celecoxibe tem uma seletividade de 7,6 e rofecoxibe uma seletividade de 35 em favor da COX-2 (RIENDEAU et al., 2001). Uma segunda geração de inibidores mais seletivos da COX-2 foi desenvolvida. O sucessor do celecoxibe, valdecoxibe tem uma proporção de seletividade de 30 e o etoricoxibe, o sucessor do rofecoxibe, tem uma seletividade de 106 (RIENDEAU et al., 2001). O parecoxibe, um pró-fármaco injetável do valdecoxibe, é também usado no tratamento de dor aguda (CHEER & GOA, 2001). O lumiracoxibe (DING e JONES, 2002) difere dos outros coxibes na sua estrutura. Ele é derivado do ácido fenil acético em vez da sulfonamida ou sulfona, e comparado aos outros AINEs seletivos não causa efeitos colaterais cardiovasculares e apresenta menos complicações gastrointestinais (SCHNITZER et al., 2004).

Efeitos colaterais no sistema cardiovascular são relatados em pacientes tratados, de forma crônica, com AINEs seletivos, incluindo infarto do miocárdio. Tem sido sugerido que os inibidores seletivos previnem a síntese de uma prostaglandina anti-trombótica, a prostaciclina (PGI_2), sintetizada por células endoteliais, preservando a ação do pró-trombótica do tromboxano (TXA2) nas plaquetas (McADAM et al., 1999). Valdecoxib e parecoxib também são associados com um aumento na incidência de eventos cardíacos, quando usados contra dor após cirurgia coronariana (NUSSMEIER et al., 2005). Desde então os AINEs seletivos são utilizados com cuidado, sendo que alguns foram retirados do mercado devido ao risco de efeitos cardiovasculares. Recentes estudos epidemiológicos mostraram que todos AINEs em doses antiinflamatórias aumentam o risco de infarto do miocárdio (HIPPISEY-COX & COUPLAND, 2005).

Atualmente em alguns países um coxibe é licenciado para uso em equinos, o firocoxibe. Ele é indicado no tratamento de dores músculo esqueléticas, principalmente

articulares, e tem efeito analgésico semelhante à fenilbutazona, porém sem os efeitos colaterais desta quando administrado de forma prolongada (DOUCET et al., 2008). Este AINE pode ser vantajoso em cavalos com recuperação de lesão intestinal isquêmica, pois ao contrário do flunixin meglumine, ele não causou retardo na recuperação da mucosa lesada e produz efetiva analgesia visceral (COOK et al., 2009)

2.4.2. Meloxicam

O meloxicam é um AINE derivado do ácido enólico (PANARA et al., 1999), membro da classe dos oxicans. Este composto também tem propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas (CURRY et al., 2005). Ele é usado principalmente no tratamento de osteoartrite em cães, e também tem sido usado em cavalos em alguns países inclusive no Brasil. Em caninos o meloxicam é bem absorvido após administração oral e apresenta grande afinidade pelas proteínas plasmáticas. Este AINE sofre extensa recirculação enterohepática e metabolismo hepático. Os metabólitos do meloxicam não tem mostrado efeito farmacológico, e ambos, fármaco intacto e seus metabólitos são excretados primariamente nas fezes (CURRY et al., 2005; WALLACE, 2003).

O uso do meloxicam em cavalos vem sendo investigado há alguns anos. Um estudo sobre a farmacocinética forneceu a evidência de que o fármaco se ajusta em um modelo de bi compartimento e também revelou que a dose diária de 0,6 mg/kg é adequada para o uso em cavalos pela via oral ou intravenosa (TOUTAIN et al., 2004).

O meloxicam tem sido classificado como um inibidor preferencial da COX-2. Ele tem atividade antiinflamatória potente, inibindo os sinais sistêmicos e locais de artrite em modelos experimentais, com baixa toxicidade (ENGELHARDT et al., 1995; ENGELHARDT, 1996; NOBLE & BALFOUR, 1996). Ao contrário do flunixin meglumine, o meloxicam não diminui a recuperação da função de barreira da mucosa do jejun lesada. Ainda produz uma melhora no escore de dor pós operatória e no quadro clínico. Sendo assim uma alternativa para o tratamento pós operatório de cólica (LITTLE et al., 2007).

A dose indicada para a espécie eqüina é de 0,6 mg/kg por via intravenosa ou via oral, podendo ser administrada a cada 24 horas (LEES et al., 1991; TOUTAIN & CESTER, 2004).

2.4.3. Cetoprofeno

O cetoprofeno [(6)-2 (3-benzoílfenil) propionico] é um AINE aprovado para uso em cavalos para o alívio da dor e inflamação associadas com lesão músculo esqueléticas e em casos de cólica. Ele é um AINE membro da classe do ácido propiônico, que inclui o ibuprofeno, naproxeno e fenoprofeno. A dose intravenosa recomendada é de 2,2 mg/kg uma vez ao dia por no máximo 5 dias consecutivos (OWENS et al., 1995).

O cetoprofeno existe como duas formas de enantiômeros (R e S) que são rapidamente absorvidas e eliminadas, tem baixo volume de distribuição e é altamente ligado as proteínas plasmáticas (BRINK et al., 1998). Embora a dose recomendada para um cavalo adulto seja 2,2 mg/kg, estudos recentes recomendam um aumento de 1,5 vezes na dose para um potro com menos de 24 horas de vida devido ao grande volume de distribuição (WILCKE et al., 1998). A articulação inflamada em modelo de sinovite eqüina serve como um local de seqüestro para o cetoprofeno, o que pode resultar em uma melhora e aumento na sua eficácia em articulações inflamadas, em comparação com articulações sadias (OWENS et al., 1995). Além disso, a farmacocinética plasmática pode ser alterada por uma inflamação em compartimentos periféricos como a articulação. Em um experimento o cetoprofeno foi administrado pela via oral, mas foi pouco biodisponível, independentemente do programa de alimentação (LANDONI & LEES, 1995 a, b). Apesar disto, formulações orais do cetoprofeno são comercializadas no Brasil e em outros países (SODERLUND et al., 2007) com bom resultados.

O cetoprofeno é classificado como um inibidor de dupla ação, atuando tanto sobre a cicloxigenease quanto sobre a 5-lipoxigenase (BETLEY et al., 1991). Isto poderia ampliar seu efeito antiinflamatório, transformando-o em um AINE mais efetivo. Entretanto, experimentos *in vitro* e *in vivo* dosando os níveis de leucotrieno B4 (LTB4) após o tratamento com cetoprofeno não tem comprovado sua superioridade (SALMON et al., 1984; LANDONI & LEES, 1995 a, b). Efusão articular e claudicação são reduzidos em 3 a 6 horas após a administração IV de cetoprofeno. Ele fornece boa a excelente analgesia para dor musculoesquelética, mas sua eficácia não é considerada superior aos outros AINES (OWENS et al., 1996). A eficácia do cetoprofeno comparada com outros AINES para aliviar a dor e inflamação músculo esquelética tem sido avaliada em inúmeros estudos com resultados ambíguos. Em um modelo de sinovite no carpo, cetoprofeno teve efeito

semelhante ao flunixin meglumine, mas foi menos efetivo que fenilbutazona (OWENS et al., 1996). Entretanto, em um modelo de laminita crônica o cetoprofeno, em uma dose maior que a recomendada (3,63 mg/kg), foi mais efetivo que fenilbutazona (4,4 mg/kg) diminuindo significativamente a dor por até 24 horas (OWENS et al., 1995). A explicação para a variação destes resultados não é clara, mas eles são consistentes com os resultados de outras espécies, incluindo o homem. Além disso, o cetoprofeno tem se mostrado menos ulcerogênico que o flunixin meglumine e a fenilbutazona (MacALLISTER et al., 1993). Neste trabalho os cavalos tratados com fenilbutazona e flunixin meglumine desenvolveram lesões no estômago e intestino juntamente com necrose da crista renal. A propensão do cetoprofeno em se acumular nos locais inflamados e ser rapidamente eliminado explica parcialmente a baixa toxicidade (MAY & LEES, 1996). Ele é indicado para utilização em eqüinos em casos de cólica e no tratamento de processos inflamatórios e dolorosos do sistema músculo-esquelético, devido baixa ação degenerativa sobre as cartilagens (LANDONI & LEES, 1995; TASAKA, 2002).

O cetoprofeno pode inibir a formação de tromboxanos e prostaglandinas em eqüinos, pois ambos são produtos da via ciclooxygenase (LANDONI & LEES, 1995). Outros resultados com AINEs, incluindo o cetoprofeno, indicam que estes componentes podem ter efeitos em outras vias inflamatórias além da ciclooxygenase já que tanto o cetoprofeno como o flunixin meglumine inibem o edema induzido por bradicinina (LANDONI & LEES, 1995). Em outros estudos, com amostras de pulmão humano e neutrófilos de coelhos, também foi demonstrado que o cetoprofeno inibiu a atividade da lipoxigenase. Entretanto, estes achados não foram confirmados em cavalos (JACKMAN et al., 1994; LANDONI & LEES, 1995).

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:

**FARMACOCINÉTICA DO MELOXICAM EM PÔNEIS COM SINOVITE, E EM
PÔNEIS E CAVALOS SAUDÁVEIS**

**Ricardo Pozzobon, Mara I. B. Rubin, Karin E. Brass, Sérgio L. Dalmora, Marcos S.
Azevedo, Daniele R. Nogueira, Flávio D. De La Corte**

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010

Farmacocinética do meloxicam em pôneis com sinovite induzida, e em pôneis e em cavalos saudáveis.

Meloxicam pharmacokinetics in ponies with synovitis, healthy ponies and healthy horses

Ricardo Pozzobon, Mara I. B. Rubin, Karin E. Brass, Sérgio L. Dalmora, Marcos S. Azevedo, Daniele R. Nogueira, Flávio D. De La Corte

Resumo

O estudo da farmacocinética do meloxicam oral foi realizado com três grupos distintos de eqüinos com três animais cada. Um grupo formado por pôneis com sinovite induzida, um grupo com pôneis saudáveis e outro grupo com cavalos saudáveis. Todos os animais foram tratados com a dose indicada (0,6 mg/kg via oral). As amostras de sangue para obtenção do plasma foram coletadas antes (tempo 0), 15, 30 minutos e 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-medicação. O tempo da concentração máxima do fármaco (Tmax) foi mais tardio ($P<0,05$) nos cavalos e a concentração plasmática máxima (Cmax) foi maior ($P<0,05$) nos pôneis saudáveis. As primeiras concentrações plasmáticas foram atingidas mais rapidamente ($P<0,05$) nos grupos de pôneis. Os parâmetros da farmacocinética diferiram entre os pôneis saudáveis e com sinovite. Isto pode ser atribuído a uma possível migração do fármaco para o local da lesão. A absorção do meloxicam foi mais rápida nos pôneis do que nos cavalos.

Palavras-chave: Ciclooxygenase-2, anti-inflamatório não esteroidal, sinovite, eqüinos.

Abstract

This study evaluated meloxicam pharmacokinetics on 3 groups with 3 animals each: a group of ponies with induced synovitis, a group of healthy ponies and a group of healthy horses. All animals were treated with the recommended dosage (0.06 mg/kg, PO) of meloxicam. Plasma was obtained from blood samples collected before (time 0), 15 and 30 minutes, and 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours after medication. The time to reach the maximum plasma concentration (Tmax) was longest ($P<0.05$) in horses and the maximum concentration (Cmax) was highest ($P<0.05$) in healthy ponies. The initial plasma concentrations were achieved more quickly ($P<0.05$) in both ponies groups.

pharmacokinetics differed between healthy ponies and those with synovitis. This may be the result of drug migration to the injury site. Meloxicam absorption was faster in ponies.

Key-words: Cyclooxygenase-2, nonsteroidal anti-inflammatory drug, synovitis, equine.

Introdução

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são muito utilizados na medicina veterinária por terem ação anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antitrombótica e antiendotóxica (MacAllister, 1994; Livingston, 2000; Moses & Bertone, 2002). Meloxicam é um AINE ácido enólico do grupo dos oxicans (Moses & Bertone, 2002) e é aprovado para uso em equinos em países da Europa e no Brasil. No Canadá e Estados Unidos é liberado para uso em pequenos animais. O meloxicam é utilizado para o tratamento de doenças musculoesqueléticas (Cross et al., 1997), osteoartrites (Doig et al., 2000) e como analgésico pré operatório (Budsberg et al., 2002). Experimentos em eqüinos comprovaram o potente efeito analgésico do meloxicam em sinovite induzida (Toutain et al., 2004b).

Atualmente se sabe que existem duas isoformas de ciclooxygenase (COX), COX-1 e COX-2, e que ação dos AINEs se dá pela inibição destas enzimas. A maioria dos AINEs utilizados na medicina eqüina inibe mais a COX-1 que a COX-2, mas alguns como o meloxicam, inibem preferencialmente a COX-2 (Moses & Bertone, 2002; Beretta et al., 2005). Alguns AINEs mais seletivos da COX-2, os chamados coxibes, também estão sendo testados em equinos, entre eles o firocoxib e o parecoxib (Pozzobon et al., 2008). Devido a esta seletividade destes AINEs sobre a COX-2, estes fármacos são associados com uma diminuição da ocorrência de efeitos adversos como úlceras do trato gastrointestinal e lesões renais (Jones & Budsberg, 2000).

Existem diferenças na eficácia de AINEs entre eqüinos e entre espécies. Estas diferenças podem ser causadas por variações na farmacocinética, meia vida do AINE, concentração de proteína plasmática, ritmo circadiano; interação entre medicamentos; e doenças renais e hepáticas (Moses & Bertone, 2002). Certas condições como inflamações localizadas (sinovite) (Owens et al., 1995; Toutain et al., 2004b), e o tamanho dos animais (Sans, 1991) também podem influenciar sobre os parâmetros de farmacocinética. Além

disso, alguns testes de campo têm resultados diferentes quanto a eficácia analgésica do meloxicam no tratamento de doenças articulares graves. Estas variações clínicas e farmacocinéticas, também verificadas em trabalhos, podem determinar o sucesso no tratamento ou a ocorrência de efeitos tóxicos. Sendo assim, nesta pesquisa comparou-se a farmacocinética do meloxicam em pôneis com sinovite induzida, pôneis saudáveis e cavalos de grande porte saudáveis.

Material e métodos

Para a análise de farmacocinética foram utilizados seis garanhões pôneis pesando em média 170 kg e três cavalos (duas fêmeas e um macho) com peso médio de 500 kg. Todos os animais estavam clinicamente sadios, com alimentação a base de campo nativo e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos da seguinte forma: um grupo (pôneis sinovite) foi formado por três pôneis, nos quais foi induzida sinovite na articulação radio-carpiana com adjuvante completo de Freund (White *et al*, 1996), outro grupo (pôneis saudáveis) foi formado por três pôneis saudáveis e o último grupo (cavalos saudáveis) foi formado por três cavalos de grande porte saudáveis. Após três dias da indução da sinovite no primeiro grupo, todos os grupos foram tratados com meloxicam via oral na dose única de 0,6 mg/kg. Através da punção da veia jugular, foi coletado sangue para obter amostras de plasma antes (tempo 0), 15, 30 minutos e 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-medicação. Após a centrifugação do sangue, as amostras de plasma foram armazenadas a -80°C até a determinação plasmática do meloxicam.

As amostras de plasma para determinação do meloxicam foram analisadas através de um método validado por cromatografia líquida de alta execução (HPLC). Meloxicam e piroxicam (padrão interno) foram extraídos do plasma por extração líquido-líquido usando terc-butil metil éter como solvente de extração. Utilizou-se coluna analítica Phenomenex Synergi 4 μ Fusion C18, mantida a 30°C, com detecção UV em 360 nm. A fase móvel constituída de acetonitrila 95%: tampão fosfato (KH_2PO_4) 0,025 M (pH 3,0) (50:50, v/v), foi eluída isocraticamente na vazão de 1,0 mL/min. A metodologia foi co-avaliada avaliando-se parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, recuperação e especificidade.

A separação cromatográfica foi obtida em 8 min, mostrando-se linear na faixa de 25-3000 ng/mL ($r^2=0,9999$). O método de extração desenvolvido propiciou significativa recuperação média para o meloxicam (85,51%) e piroxicam (73,50%). Foram avaliadas a precisão intra dia e inter dias, apresentando resultados com coeficiente de variação inferiores a 2,6% e 6,12% respectivamente. A exatidão do método proposto foi demonstrada pelos valores médios obtidos de 104,46% e 105,01% para exatidão intra dia e inter dias, respectivamente.

Os dados da farmacocinética foram analisados quanto a área sob a curva de concentração (ASC), pico da concentração plasmática do fármaco (Cmax) e tempo da concentração máxima (Tmax), primeiro momento em que apareceu o meloxicam no plasma (Tmd) e realizada análise de variância das médias (ANOVA), seguido de teste Tukey para avaliar diferença estatística entre os grupos. A diferença foi considerada significativa quanto $P<0,05$.

Resultados

Os dados de farmacocinética obtidos são apresentados na tabela 1. A Cmax foi maior ($P<0,05$) nos pôneis saudáveis e similar entre os pôneis com sinovite e cavalos. Já o Tmax foi maior ($P<0,05$) nos cavalos e igual nos outros grupos. O meloxicam atingiu o plasma mais rápido ($P<0,05$) nos grupos dos pôneis (Tab.1; Fig.1).

Analizando também as curvas de concentração (Fig. 1) notamos que nos pôneis o meloxicam atingiu concentrações plasmáticas mais rapidamente (15-30 minutos) que nos cavalos (60 minutos), sendo que após oito horas as concentrações decaíram de forma semelhante até a última coleta (24 horas).

Discussão

A concentração plasmática atingida mais rapidamente nos pôneis pode ser devido ao menor comprimento do trato gastrointestinal em relação aos cavalos maiores. Pois como o meloxicam é absorvido principalmente no duodeno (Toutain et al., 2004a), é possível que nos pôneis o fármaco tenha atingido mais rápido essa porção do intestino. Experiências

com animais sugerem que meloxicam é predominantemente distribuído para compartimentos altamente perfundidos (ricos em albumina), como o sangue, fígado, rim, etc (Busch et al, 1998). A Cmax plasmática menor nos pôneis com sinovite sugere uma rápida migração do meloxicam ao sitio da inflamação. Isto é suportado por outros resultados, onde 40-45% do meloxicam plasmático é encontrado no líquido sinovial, e concentrações mais baixas observadas em tecidos adjacentes (Degner et al., 1994). Além disso, o tecido inflamado é caracterizada por extravasamento e, provavelmente, a diminuição do pH, comparado com o tecido não-inflamado. Tais condições são ideais para servir de seqüestro para AINEs da circulação, e altas concentrações de meloxicam no tecido inflamado têm sido observadas em modelos animais (Busch & Engelhardt, 1990).

Esta interferência na disposição do fármaco tem sido verificada em outros trabalhos com o meloxicam (Toutain et al., 2004b) e com cetoprofeno (Owens et al., 1995) em equinos. Além disso, em outros trabalhos foi comprovado que a farmacocinética plasmática pode ser alterada por uma inflamação em compartimentos periféricos como na articulação (Landoni & Less, 1995 a, b).

Os resultados de farmacocinética são provavelmente favoráveis a uma eficácia clínica do meloxicam no tratamento de doenças articulares. As concentrações alcançadas em todos os grupos são compatíveis com a inibição de ciclooxigenase-2 (COX-2) (Beretta et al., 2005). Porém em nossa rotina clínica e em uma avaliação da farmacodinâmica do meloxicam os resultados demonstraram um baixo efeito analgésico no tratamento de sinovite de grau grave (dados não publicados). Entretanto, Toutain et al. (2004b) demonstraram o potente efeito antiinflamatório e analgésico no tratamento do mesmo modelo de sinovite utilizado em nosso trabalho. Esta diferença de resultados pode ser porque no presente trabalho a Cmax foi menor em todos os grupos ($0,71\mu\text{g}/\text{ml}$ nos pôneis com sinovite, $1,23\mu\text{g}/\text{ml}$ nos pôneis saudáveis e $0,75\mu\text{g}/\text{ml}$ nos cavalos) comparado aos outros trabalhos ($2,58\mu\text{g}/\text{ml}$ em cavalos com acesso ao alimento e $1,73\mu\text{g}/\text{ml}$ em cavalos em jejum) (Toutain et al., 2004 a,b). Também, outro fator é que nos demais trabalhos onde foi avaliado a farmacodinâmica, foram usados eqüinos pesando entre 350 e 606 kg, enquanto que os pôneis deste trabalho pesaram em média 170 kg.. Geralmente a taxa de eliminação em animais menores é subestimada, enquanto que em animais maiores é

superestimada (Sams, 1991). Isto justifica o Tmax maior no grupo dos cavalos em relação aos pôneis.

Todos os grupos de animais em nosso trabalho tiveram acesso à forragem. O Tmax dos dois grupos de pôneis foi menor comparado ao de cavalos com acesso ao alimento (3,4 horas) em outro trabalho (Toutain et al., 2004 a), porém no grupo dos cavalos o Tmax foi mais próximo aos dados da literatura. Toutain et al., (2004 a), verificaram que o Tmax do meloxicam foi maior e a Cmax foi menor em cavalos com acesso ao alimento do que não alimentados. Isto sugere que condições do trato gástrico (contendo alimento) retardam substancialmente a proporção de absorção do meloxicam após administração oral. Isto foi verificado somente nos cavalos deste trabalho, ou seja, nos pôneis a absorção foi realmente mais rápida e não sofreu interferência do alimento, o que é favorável a aplicação da formulação oral do meloxicam nessa raça de equino.

Conclusão

A farmacocinética nos três diferentes grupos foi diferente. Entre os pôneis o que contribui para a diferença foi a sinovite, pois o meloxicam provavelmente migrou para o local inflamado, o que é favorável para a eficácia de AINEs. A absorção do meloxicam foi mais lenta nos cavalos, e pode ser devido ao alimento no trato gastrointestinal. A absorção do meloxicam nos pôneis não sofreu influência do alimento e/ou o comprimento do trato gastrointestinal mais curto favoreceu a absorção mais rápida. Os dados demonstram uma farmacocinética favorável do meloxicam para utilização em cavalos pôneis na mesma dosagem de cavalos maiores (0,6 mg/kg).

Referencias bibliográficas

BERETTA, C., GARAVAGLIA, G., CAVALLI, M. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: An in vitro analysis. **Pharmacological Research.** v. 52, 302-306, 2005.

BUDSBERG, S. C., et al. Evaluation of intravenous administration of meloxicam for perioperative pain management following stifle joint surgery in dogs. **American of Journal Veterinary Research.** v. 63, p. 1557-1563, 2002.

BUSCH, U.; ENGELHARDT, G. Distribution of [14C] meloxicam in joints of rats with adjuvant arthritis. **Drugs Experimental of Clinical Research.** v. 16, p. 49-52, 1990.

BUSCH, U., et al. Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. **Drug Metabolism and Disposition.** v. 26, p. 575-584, 1998.

CROSS, A. R., BUDSBERG, S. C., KEEFE, T. J. Kinetic gait analysis assessment of meloxicam efficacy in a sodium urate-induced synovitis model in dogs. **American of Journal Veterinary Research.** v. 58, p.626-631, 1997.

DOIG, P. A., et al. Clinical efficacy of meloxicam in dogs with chronic osteoarthritis. **Canadian of Veterinary Journal.** v. 41, p. 296-300, 2000.

JONES, C. J., BUDSBERG, S. C. Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. **Journal of American Veterinary Medicine Association.** v. 217, p. 721-729, 2000.

LANDONI, M. F.; LEES, P. Comparison of the anti-inflammatory actions of flunixin and ketoprofen in horses applying PK/PD modeling. **Equine Veterinary Journal.** v. 27, p. 247-256, 1995a.

LANDONI, M. F.; LEES, P. Influence of formulation on the pharmacokinetics and bioavailability of racemic ketoprofen in horses. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics.** v. 18, p. 446-450, 1995b.

LIVINGSTON, A. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Veterinary Clinical of North American: Small Animal Practice.** v. 18, p. 21-37, 2002.

MacALLISTER, C. Nonsteroidal of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Veterinary Medicine.** v. 89, p. 237-240, 1994.

OWENS, J. G., KAMERLING, S. G., BARKER, S. A. Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics,** v.18, 1995, p. 187-195.

POZZOBON R. et al. Efeito clínico do uso do parecoxib em modelo de sinovite induzida em pôneis. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences.** v.60, p.806-814, 2008.

SAMS, R. A. Principles of drug disposition and drug interaction in horses. In: MUIR, W. W. & HUBBELL, J. A. E. **Monitoring and emergency therapy.** St. Louis: Mosby, 1991. Cap. 9. p. 180-198.

TOUTAIN, P., et al. Pharmacokinetics of meloxicam in plasma and urine of horses. **American Journal of Veterinary Research.** v.65, p.1542-1547, 2004 a.

TOUTAIN, P., et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal joint. **American of Journal Veterinary Research.** v. 65, p. 1533-1541, 2004 b.

WHITE, G. W. et al. Efficacy of systemically administered antiarthritic drugs in an induced equine carpitis model. **AAEP Proceedings,** v. 42, p. 135-138, 1996.

Tabela 1. Parâmetros da farmacocinética do meloxicam no plasma após administração oral na dose de 0,6 mg/kg. Valores são médias \pm erro padrão da média (SEM).

Parâmetros	Pôneis sinovite n=3	Pôneis saudáveis n=3	Cavalos saudáveis n=3
ASC (ng*h/ml)	5803 \pm 1138 ^a	8787 \pm 826,1 ^a	9530 \pm 1149 ^a
Cmax (ng/ml)	705,1 \pm 87,87 ^a	1239 \pm 92,19 ^b	748 \pm 124,9 ^a
Tmax (horas)	1,67 \pm 0,33 ^a	2,0 \pm 0,0 ^a	5,33 \pm 1,33 ^b
Tmd (horas)	0,33 \pm 0,08 ^a	0,41 \pm 0,08 ^a	1,0 \pm 0,0 ^b

ASC área sob a curva de concentração plasmática; Cmax pico de concentração máxima; Tmax tempo do pico de concentração máxima; Tmd primeiro momento em que apareceu o meloxicam no plasma. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P<0.05$)

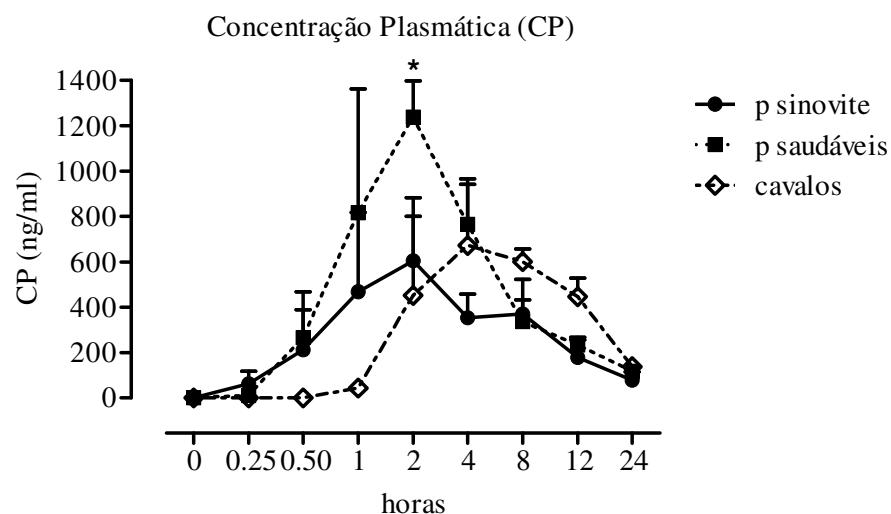


Figura 1. Concentração plasmática do meloxicam nos diferentes grupos no decorrer do tempo (0-24 horas). Valores são médias \pm SEM. * ($P<0,05$).

4. CAPÍTULO 2

TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:

**LONG TERM ADMINISTRATION OF MELOXICAM AND KETOPROFEN
CAUSES NO ADVERSE EFFECTS ON HAEMATOLOGICAL AND
BIOCHEMICAL PARAMETERS, AND GASTRIC MUCOSA OF HEALTHY
PONIES**

**Ricardo Pozzobon, Karin E. Brass, Mara I. B. Rubin, Marcos S. Azevedo, Gabriele B.
da Silva, Flávio D. De La Corte, Clóvis Paniz, Rochele C. R. Pozzobon, Enzo R.
Milanello**

The Veterinary Journal, 2010

Long term administration of meloxicam and ketoprofen causes no adverse effects on haematological and biochemical parameters, and gastric mucosa of healthy ponies

Ricardo Pozzobon^{a1}, Karin E. Brass^a, Mara I. B. Rubin^a, Marcos S. Azevedo^a Gabriele B.Silva^a, Flavio D. De La Corte^a, Clóvis Paniz^b, Rochele C. R. Pozzobon^c, Enzo R. Milanello^a

^a Department of Large Animal Clinics, Veterinary Teaching Hospital, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil, ^b Clinical Pathology Laboratory, University Hospital of Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brazil, ^c Department of Clinical and Toxicological Analysis, UFSM, Santa Maria, Brazil

Abstract

To evaluate the effect of long term use of meloxicam, a non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) (preferential cyclooxygenase (COX) 2 inhibitor), and ketoprofen (nonspecific COX inhibitor) on hematological and biochemical parameters as well as on the gastric mucosa, healthy ponies (n=6) were treated once daily for 30 days, with meloxicam (0.6 mg/kg PO), ketoprofen (positive control, 2.2 mg/kg PO, n=6) or left untreated (Control, n=6). Fibrinogen (F), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), platelet count (PC), red (RBC) and white blood cell count (WBC), packed cell volume (PCV), hemoglobin (Hb), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (AP) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) were determined before starting (week 0), during (weeks 1, 2, 3, 4) and after treatment (week 5). Gastroscopic examination was performed before (week 0) and after treatment (week 5). No changes ($P>0.05$) between groups were detected on any of the evaluated parameters. Meloxicam and ketoprofen given once daily orally for 30 days, at the manufacturers recommended dose did not alter the hematological and biochemical profiles, neither caused gastric ulceration in healthy ponies.

Keywords: Nonsteroidal anti-inflammatory drug; Cyclooxygenase-2; Coagulation; Horses

¹ Corresponding author. E-mail address: ricardopozzobon@yahoo.com.br (R. Pozzobon)

Introduction

Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the most used pharmacological agents in veterinary medicine because of their analgesic, anti-inflammatory, antipyretic, antithrombotic and antiendotoxic effects. Horses with osteoarthritis, laminitis or other chronic conditions are frequently treated for many days with NSAIDs (MacAllister, 1994). The therapeutic action of NSAIDs is based on the inhibition of COX and subsequent prostanoids (Vane and Botting, 1998). There are two COX isozymes, COX-1 (constitutive form) and COX-2 (inducible form). Prostanoids, products of COX-1 activity, act on maintaining gastrointestinal mucosal integrity (prostacyclin – PGI₂), modulating renal blood flow (prostaglandin E₂ - PGE2) and platelet function (tromboxane A₂ – TXA₂). COX-2, on the other hand, is expressed especially under inflammatory conditions or in injured tissues where it stimulates PG synthesis that generates the inflammatory reaction (Jones and Budsberg, 2000). As some tissues like brain, kidneys and uterus express COX-2 constitutively, it cannot be considered solely an inflammatory marker (Gibb and Sun, 1996). Meloxicam is a NSAID with preferential action on COX-2 (Brideau et al., 2001; Beretta et al., 2005) and ketoprofen is an unspecific inhibitor, both used in horses (Owens et al., 1995 and 1996; Toutain et al., 2004a,b).

Hemostasis can be divided in development of a platelet plug (primary hemostasis) and stabilization of the platelet plug with cross-linked fibrin formation (secondary hemostasis), followed by clot destruction by fibrinolysis (Carvalho, 1998). Primary hemostasis is mediated by interaction between vascular endothelium and platelets. Platelets express COX-1 but not COX-2 activity (Lemke et al., 2002). Inhibition of COX-1 activity by non selective NSAIDs reduces TXA₂ production and can reduce platelet aggregation or inhibit primary coagulation. NSAIDs that show high COX-2 affinity do not have a relevant effect on TXA₂ production or platelet aggregation (Jones and Budsberg, 2000). Adverse effects on the cardiovascular system like heart infarct were described in patients treated with selective NSAIDs. The hypothesis is that selective inhibitors prevent the synthesis of the antithrombotic prostaglandin, prostacyclin, synthesized by endothelial cells, preserving the aggregating and vasoconstricting effect of TXA₂. This results in a loss of balance in the platelet aggregation system favoring thrombus formation and vasoconstriction (Bennett et

al., 2005; Nussmeier et al., 2005). This TXA₂/PGI₂ balance is crucial in keeping hemostasis. Acute inflammation in response to endotoxemia activates the coagulation cascade. Inflammatory induced coagulation can result in disseminated intravascular fibrin deposition (DIC - disseminated intravascular coagulation) (Hambleton et al., 2002). DIC may cause thrombosis and occlusion of capillaries contributing to the development of multiple organ dysfunction, including laminitis as thrombi have been identified in the digital vasculature of horses with induced or naturally occurring laminitis (Weiss et al., 1997; Hood et al., 1993). Complexes of aggregated platelets and neutrophils occur in laminitis (Weiss et al., 1997) and a platelet aggregation inhibitor was effective in reducing laminitis incidence (Weiss et al., 1998).

As acute inflammation can influence the coagulation cascade, changes in coagulation also can modify the inflammatory reaction (Levi et al., 2002). Platelet aggregation and coagulation promote endothelial inflammation and leucocyte margination and adhesion in organ tissues in human sepsis. Platelets probably play a similar role in the initial stages of laminitis (Weiss et al., 1997).

The prolonged treatment with meloxican was evaluated in order to determine the occurrence of a possible imbalance on the inflammatory system (COX inhibition) and consequently on hemostasis and compare the results to those obtained by using ketoprofen (positive control). The effect of the two drugs on the gastric mucosa and some biochemical parameters also was evaluated.

Material and methods

Six healthy, 4 to 10 year old pony stallions were distributed into 3 groups with two ponies each. The stallions were maintained on the same paddock with natural grass and access to water *ad libitum*. The ponies of one group were treated with 0.6mg/kg of oral (PO) meloxican, while the ones of another group were treated with 2.2mg/kg of ketoprofen PO (positive control), both once daily for 30 days. The third group received no treatment and remained as a control. The study was performed using a crossover design with 3 repetitions of the hematological analysis and 2 repetitions of the biochemical and gastroscopic evaluations, with a washout period of 8 month between repetitions. This way

each pony participated in all groups and a final n of 18 was reached (6 per group) on hematological analysis; a final n of 12 (4 per group) in biochemical and gastroscopic evaluations. Blood samples were collected from the jugular vein with 21G needles and 5 ml syringes and immediately transferred to tubes containing EDTA for determination of complete blood and platelet counts (automatic analyzer Coulter STKS) or glass tubes without anticoagulant for serum chemistry analysis. Whole blood, for coagulation analysis, was collected into tubes containing sodium citrate 3.8%. Samples were obtained before (week 0), weekly during the treatment period (weeks 1-4) and one week after finishing treatment (week 5). Coagulation analysis evaluated prothrombin time, fibrinogen and partial activated thromboplastin time using test reagents (automatic coagulation analyzer Sysmix TA-560). Serum aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase were assayed using automated methods (Integra 400 Roche).

An endoscopic examination of the pharyngeal, oesophageal and gastric mucosa (squamous epithelium and fundus) of each pony, was performed after 12 hour fasting once before (week 0) and one week after finishing treatment (week 5). Hematological evaluation as well as gastric endoscopy was performed blind, i.e. the examiners were unaware to which group the ponies belonged to.

The study was approved by UFSM Animal Welfare Ethic Committee.

The assessment of treatment effect on hematological and biochemical parameters was performed as repeated measures and analyzed using the MIXED procedure with a repeated measure statement. Main effects on treatment group, week of blood collection and their interaction were determined. Differences between blood parameters at a specific time point were compared between groups using estimates. All analyses were performed using SAS software package (SAS Institute Inc., Cary, NC). Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). P<0.05 was considered statistically significant.

Results

The hematological parameters (fig. 1) were not ($P>0.05$) affected neither by meloxicam nor by ketoprofen 30 day treatment. However there was an effect of week ($P<0.05$) on fibrinogen, prothrombin time and partial activated thromboplastin time. No

changes were found on blood chemistry (fig. 2) and gastroendoscopic examination in the ponies treated with meloxicam or ketoprofen. Only a minimal focal lesion of the squamous mucosa was observed in one pony of the control group.

Discussion

The results of this study showed that a 30 day long treatment with an oral formulation of meloxicam and ketoprofen, once a day, according to the manufacturer's recommended doses did not result in changes of hematological, coagulation profile and serum chemistry nor on the gastric mucosa of healthy ponies. Both, dose and duration of treatment were safe for healthy ponies. However, clinical evaluation is always recommended, especially in animals showing any signs of cardiovascular disease or hypovolemic.

Coagulation parameters remained unchanged and within the physiological limits in all groups of this study. In dogs, preoperative use of meloxicam also did not alter hemostasis and hematologic parameters (Fresno et al., 2005). However, another study demonstrated that meloxicam administration in dogs for 5 days before surgery caused a slight increase in APTT, although it remained within physiological limits (Kazakos et al., 2005).

The effects of NSAIDs can vary between species, possibly due to differences in COX inhibition. The highly COX-2 selective NSAIDs from the human medicine, known as coxibs, are being tested in horses (Cook et al., 2009; Doucet et al., 2008; Pozzobon et al., 2008; Kvaternick et al., 2007). Rats treated with valdecoxib, showed a reduction in APTT, PT and anti-Xa activity (Fronza et al., 2006). Like in horses, meloxicam is a NSAID with preferential COX-2 inhibition in most species (Beretta et al., 2005), however, compared to the coxibs group, its action is considered very low (Kvaternick et al., 2007). The hypothesis is that besides the imbalance between PGI₂ and TXA₂, this pro-coagulant effect can be attributed to a decrease of the natural coagulation inhibitors such as antithrombin, protein C, protein S or tissue factor pathway inhibitor (Fronza et al., 2006) since there is a close relationship between the coagulation and inflammatory cascades (Levi et al., 2002). The difference between studies and species may be due to a higher or lower COX-2 inhibition.

As meloxicam is a NSAID that inhibits a little more COX-2 than COX-1, the possible imbalance between TXA₂ and PGI₂ mediators, could be smaller. This is relevant because maintaining TXA₂/PGI₂ balance is crucial for keeping hemostasis (Bennett et al., 2005; Nussmeier et al., 2005). The loss of balance between mediators, with an increase of the pro-aggregator effect on platelets and vasoconstriction could occur with the use of a highly COX-2 selective NSAID. This should be considered in laminitis patients, where platelet activation/adhesion plays an important role in the initial stage of laminitis (Weiss et al, 1997; Hood et al., 1993).

When a horse is evaluated for a condition for which gastric ulceration is a possible cause, the veterinarian should obtain a minimum database consisting of CBC and serum chemistry. The unaltered serum biochemistry, erythrocyte count, hemoglobin and PCV suggest low or no gastrointestinal toxicity (absence of gastric lesions in treated animals) of the long term use of meloxicam and ketoprofen. Phenylbutazone or flunixin meglumine toxicosis has been demonstrated to result increased PCV, thrombocytopenia and hypoproteinemia due to blood loss caused by ulcers (MacAllister, 1983; Collins and Tyler, 1985, Cohen et al., 1995).

The low toxicity of meloxicam is due to the fact that it has a preferential action on COX-2 (Beretta et al., 2005) with low inhibition of COX-1. Ketoprofen, even being a nonspecific inhibitor, is considered less toxic than phenylbutazone and flunixin meglumine (MacAllister, 1993) and it was found to be safe during 30 days. Toxicity varies between species. Dogs treated with meloxicam developed significant gastrointestinal lesions and anemia at higher doses (Alencar et al., 2003). These effects are probably more related to COX-1 inhibition (Tanaka et al., 2001), however inhibition of both, COX-1 and -2 is involved in the process of gastrointestinal injury (Gretzer et al., 2001). Moreover, the presence of gastric ulceration in itself will not always cause changes in blood parameter in adult horses, with the exception of severe pyloric ulceration with fibrosis and restricted gastric outflow in which there may be anemia and mild hypoproteinemia (Murray, 2002).

Conclusion

Meloxicam administered at 0.6 mg/kg, orally, once a day, for 30 days does not induce any adverse effects on hematological and biochemical parameters nor on the gastric mucosa.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Alencar, M.M.A., Pinto, M.T., Oliveira, D.M., Pessoa, A.W.P., Cândido, I.A., Virgínio, C.G., Coelho, H.S.M., Rocha, M.F.G., 2003. Margem de segurança do meloxicam em cães: efeitos deletérios nas células sanguíneas e trato gastrintestinal. Ciência Rural 33, 525-532.
- Bennett, J.S., Daugherty, A., Herrington, D., Greenland, P., Roberts, H., Taubert, K.A. 2005. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Circulation 111, 1713-1716.
- Beretta, C., Garavaglia, G., Cavalli, M., 2005. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: an in vitro analysis. Pharmacological Research 52, 302-306.
- Brideau, B., Staden, C.V., Chan, C.C., 2001. In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats. American Journal of Veterinary Research 62, 1755-1760.
- Carvalho, A.C.A., 1998. Hemostasis and thrombosis. In: Schiffman, F.J. Hematologic pathophysiology. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 161-244.

Cohen, N.D., Mealey R.H., Chaffin M.K., Carter, G. K., 1995. The recognition and medical management of right dorsal colitis in horses. Veterinary Medicine 90, 687-691.

Collins, L.G., Tyler D.E., 1985. Experimentally induced phenylbutazone toxicosis in ponies: description of the syndrome and its prevention with synthetic prostaglandin E2. American Journal of Veterinary Research 46, 1605-1615.

Cook, V. L., Mekyer, C. T., Campbell, N. B., Blikslager, A. T., 2009. Effect of firocoxib or flunixin meglumine on recovery of ischemic-injured equine jejunum. American Journal of Veterinary Research 70, 992-1000.

Doucet, M. Y., Bertone, A. L., Hendrickson, D., Hugles, F., MacAllister, C., McClure, S., Reinemeyer, C., Rossier, Y., Sifferman, R., Vrins, A. A., White, G., Kunkle, B., Alva, R., Romano, D., Hanson, P. D., 2008. Comparison of efficacy and safety of paste formulations of firocoxib and phenylbutazone in horses with naturally occurring osteoarthritis. Journal of the American Veterinary Medical Association 232, 91-97.

Fresno, L., Moll, J., Peñalba, B., Espada, Y., Andaluz, A., Prandi, D., Gopegui, R. R., García, F., 2005. Effects of preoperative administration of meloxicam on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time, and haematological indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. The Veterinary Journal 170, 138-140.

Fronza, M., Wrasse, M., Junior, L. B., Sangui, M. S., Dalmora, S. L., 2006. Evaluation of the changes on hemostatic parameters induced by valdecoxib in male Wistar rats. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 28, 28-32.

Gibb, W., Sun, M., 1996. Localization of prostaglandin H synthase type 2 protein and mRNA in term human fetal membranes and decidua. Journal of Endocrinology 150, 497-503.

Gretzer, B., Maricic, N., Respondek, M., Schuligoj, R., Peskar, B. M., 2001. Effects of specific inhibition of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the rat stomach with normal mucosa and after acid challenge. *British Journal of Pharmacology* 132, 1565-73.

Hambleton, J., Leung, L. L., Levi, M., 2002. Coagulation: consultative hemostasis. *Hematology*. 335-352.

Hood, D. M., Grosenbaugh, D. A., Mostafa, M. B., Morgan, S. J., Thomas, B. C., 1993. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7, 228-234.

Hopper, K., Bateman, S., 2005. An updated view of hemostasis: mechanisms of hemostatic dysfunction associated with sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 15, 83-91.

Jones, C. J., Budsberg, S. C., 2000. Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 721-729.

Kazakos, G. M., Papazoglou, L. G., Rallis, T., Tsimopoulos, G., 2005. Effects of meloxicam on the haemostatic profile of dogs undergoing orthopaedic surgery. *The Veterinary Record* 157, 444-446.

Kvaternick, V., Pollmeier, M., Fischer, J., Hanson, P. D., 2007. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. *Journal of the Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30, 208-217.

Lemke, K. A., Runyon, C. L., Horney, B. S., 2002. Effects of preoperative administration of ketoprofen on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time, and haematological indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220, 1818-1822.

Levi, M., ten Cate, H., van der Poll, T., 2002. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. Critical Care Medicine 30, 220-224.

MacAllister, C. G., 1983. Effects of toxic doses of phenylbutazone in ponies. American Journal of Veterinary Research 44, 2277-2279.

MacAllister, C., 1994. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: their mechanism of action and clinical use in horse. Veterinary Medicine 89, 237-240.

Murray, M. J., 2002. Diseases of the stomach. In: Mair, T., Divers, T., Ducharme, N. (Eds), Manual of Equine Gastroenterology. WB Saunders, London, UK, pp. 241-265.

Nussmeier, N. A., Whelton, A. A., Brown, M. T., Langford, R. M., Hoeft, A., Parlow, J. L., Boyce, S. W., Verburg, K. M., 2005. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. The New England Journal of Medicine 352, 1081-1091.

Owens, J. G., Kamerling, S. G., Barker, S. A., 1995. Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis. Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics.18, 187-195.

Owens J. G, Kamerling, S. G., Stanton, S. R., Keowen, M. L., Prescott-Mathews, J. S., 1996. Effects of pretreatment with ketoprofen and phenylbutazone on experimentally induced synovitis in horses. American Journal of Veterinary Research 57, 866-874.

Pozzobon, R., Brass, K. E., De La Corte, F. D., Silveira, E. A., Abreu, H. C., 2008 Efeito clínico do uso do parecoxib em modelo de sinovite induzida em pôneis. Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences 60, 806-814.

Tanaka, A., Araki, H., Komoike, Y., Hase, S., Takeuchi, K., 2001. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nosteroidal anti-inflammatory drugs. Journal of Physiology 95, 21-27.

Toutain, P. L., Reymond, N., Laroute, V., Garcia, P., Popot, M. A., Bonnaire, Y., Hirsch, A., Narbe, R., 2004a. Pharmacokinetics of meloxicam in plasma and urine of horses. American Journal of Veterinary Research 65, 1542-1547.

Toutain, P. L., Cester, C. C., 2004b. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal joint. American of Journal Veterinary Research 65, 1533-1541.

Vane J. R., Botting R. M., 1998. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. Inflammation Research 47, 78-87.

Weiss, D. J. Evanson, O. A., McClenahan, D., Fagliari, J. J., Dunnwiddie, C. T., Wells, R. E., 1998. Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation on experimentally induced laminitis in ponies. American Journal of Veterinary Research 59, 814-817.

Weiss, D. J., Evanson, O. A., McClenahan, D., Fagliari, J. J., Jenkins, K., 1997. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. American Journal of Veterinary Research 58, p. 1376-1380.

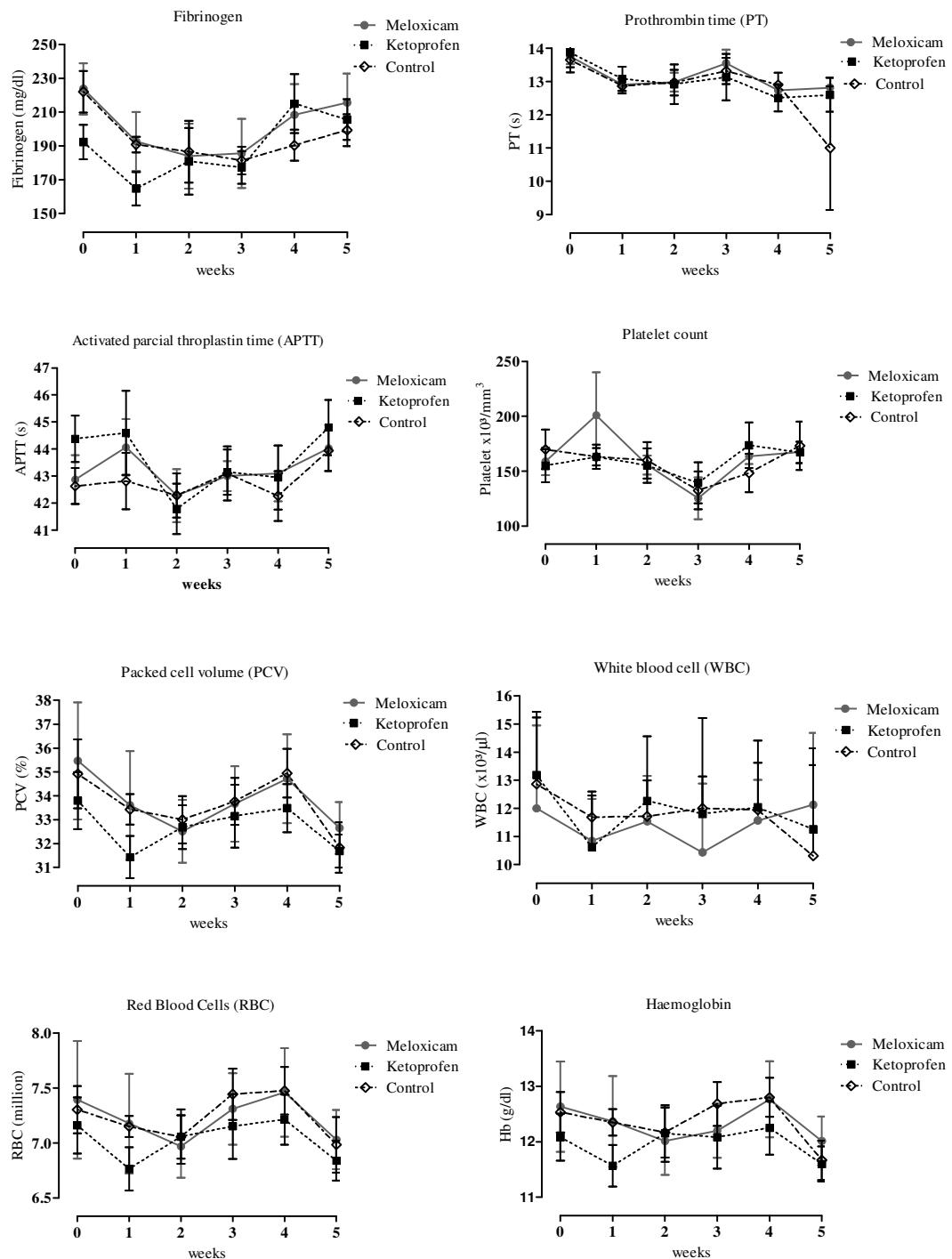


Fig. 1. Mean \pm SEM hematological parameters in ponies that received meloxicam or ketoprofen (positive control) for 30 days, or were left untreated (control group) before (week 0), during (weeks 1-4) and after treatment (week 5) ($P>0.05$).

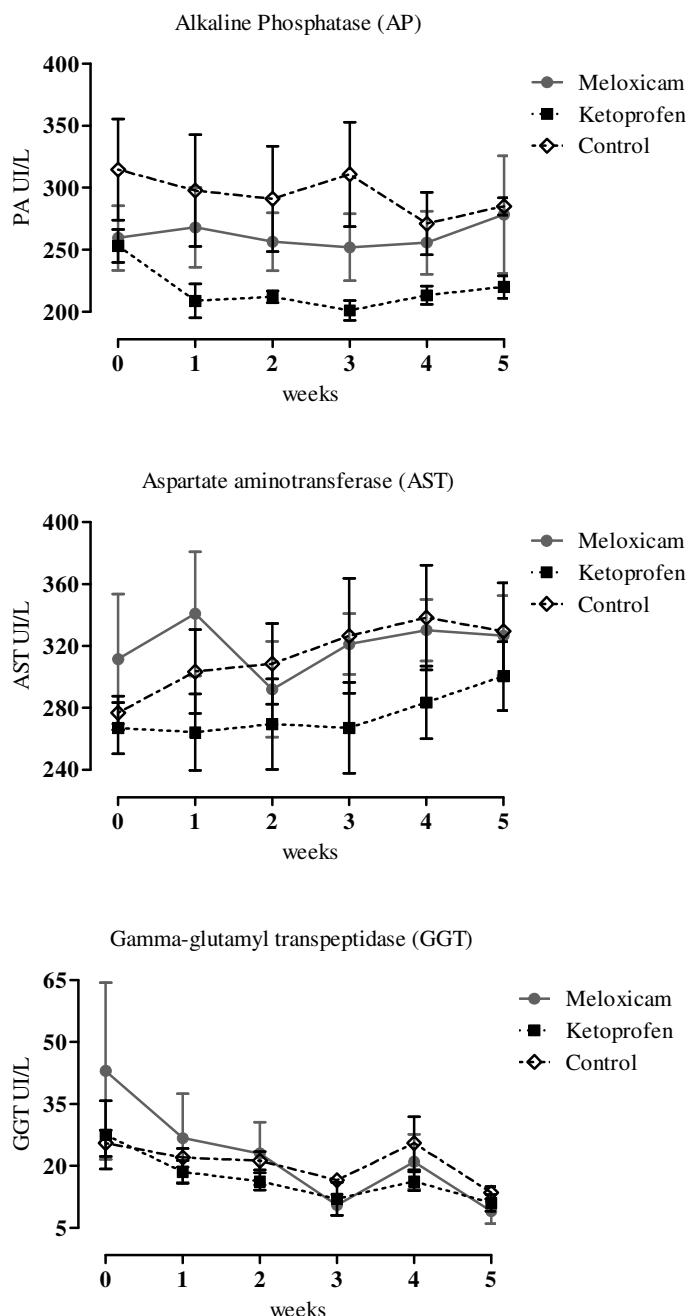


Fig. 2. Mean \pm SEM biochemical parameters in ponies that received meloxicam or ketoprofen (positive control) for 30 days, or were left untreated (control group) before (week 0), during (weeks 1-4) and after treatment (week 5) ($P>0.05$).

5. CAPÍTULO 3

TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:

**INFLUENCE OF MELOXICAM, A PREFERENTIAL CYCLOOXYGENASE-2
INHIBITOR, ON QUALITY OF PONY STALLION SEMEN**

**Ricardo Pozzobon, Mara I. B. Rubin, Karin E. Brass, Marcos S. Azevedo, Gabriele B.
da Silva, Juliano Ferreira, Sara M. de Oliveira, Flávio D. De La Corte, Bruno C.
Bernardi**

Toxicology, 2010

Influence of meloxicam, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, on quality of Pony stallion semen

Ricardo Pozzobon^a, Mara I. B. Rubin^a, Karin E. Brass^{a†}, Marcos S. Azevedo^a, Gabriele B. da Silva^a, Juliano Ferreira^b, Sara M. de Oliveira^b, Flávio D. De La Corte^a, Bruno C. Bernardi^a

^a Department of Large Animal Clinics, Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil

^b Department of Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

Abstract

The effect of 30 day long non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) treatment with meloxicam on the semen quality of pony stallions was assessed. Six Brazilian Pony stallions were distributed in 3 groups. One group was treated with meloxicam (0.6 mg/kg, PO); another group was treated with ketoprofen (2.2 mg/kg, PO) as a positive control; and the last group was not treated and remained as a negative control group. The experiment was repeated 3 times, once every 8 months, changing the animal's group (crossover) so that each group had a n=6. Semen was collected and analyzed before (week 0), during (1 to 4 weeks) and up to 80 days after treatment had finished (weeks 5 to 15). Concentration of total prostaglandins (PGs) was measured in the seminal plasma of ejaculates collected before (week 0), during (1 to 4 weeks) and after treatment (week 5 and week 15). Volume, concentration, motility, sperm defects, sperm membrane viability and functionality (hypoosmotic swelling test-HOS) were evaluated on each ejaculate. Meloxicam significantly ($P<0.05$) reduced total PGs concentration in seminal plasma. The semen of stallions treated with meloxicam had the highest number of nonviable spermatozoa, spermatozoa with impaired membrane function and tail pathologies ($P <0.05$). The week of semen collection during the experiment had a significant ($P<0.05$) effect on neck defects.

[†] Corresponding author at: Department of Large Animal Clinics, Veterinary Hospital, UFSM, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8036; E-mail addresses: karinbrass@hotmail.com (K.E. Brass).

Thirty day long meloxicam treatment lowered PGs concentration and affected semen quality. This suggests a physiological function of COX-2 in the stallion's reproductive tract.

Keywords: Stallion; Semen; NSAID; Cyclooxygenase-2; Prostaglandins

1. Introduction

Meloxicam is a NSAID of the oxicam group that has been used in horses to treat musculoskeletal injury. The NSAIDs are used for their anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antithrombotic, and antiendotoxic properties (MacAllister, 1994). Its mode of action results from inhibition of cyclooxygenase (COX) enzymes that catalyze the biosynthesis of various prostanoids from arachidonic acid (Vane and Booting, 1998). There are two distinct isoforms of COX; COX-1 which is constitutively expressed in most tissues and COX-2 which is markedly induced by inflammation (Jones e Budsberg, 2000). However, COX-2 may not be strictly considered an inflammatory marker. Some tissues such as brain, kidneys, and uterus constitutively express COX-2 with other functions beyond a simple inflammatory marker (Gibb & Sun, 1996). Other studies suggest a role, although unclear, of COX-2 in the male reproductive tract in man (Kirschenbaum et al., 2000) primates (Lazarus et al., 2004) and rodents (Lazarus et al., 2002). Meloxicam is a NSAID with preferential action on COX-2 (Brideau et al., 2001; Beretta et al., 2005) and has been tested in horses (Toutain et al., 2004a,b). These drugs may be associated with a decreased occurrence of adverse effects such as inhibition of platelet function, development of gastrointestinal tract ulcers, and impairment of renal function (Jones and Budesberg, 2000).

Many stallions participate in competitions, and this increases the risk of injury, leading to the treatment of these animals with different NSAIDs for long periods as frequently is the case with osteoarthritis and laminitis. There are few studies and conflicting results about reproductive function and semen quality in stallions treated with different anti-inflammatory drugs. The treatment of 3 stallions with 1g phenylbutazone orally twice a day for 4 weeks had no effect on the quality of fresh or frozen semen (McDonnell et al., 1992). However, Larson et al. (1986) showed that administration of 3g of phenylbutazone orally for 24 days significantly decreased the concentration of PGF_{2α} metabolites in

seminal plasma of stallions. Vedaprofem, a NSAID similar to meloxicam inhibited prostaglandin E and F series in seminal plasma of stallions, but did not affect parameters of semen quality in fresh or frozen samples (Janett et al., 2005). Some NSAIDs induce apoptosis in inflammatory cells by suppressing COX-2 (Cheuk et al., 2002) and interfering with arachidonic acid metabolism, causing its accumulation, which is cytotoxic (Monjazeb et al., 2005). The suppression of COX-2 in mice lowers sperm motility and can also interfere with sperm capacitation which is essential for fertilization (Balaji et al., 2007a). Balaji et al. (2007b) concluded that COX-2 is constitutively expressed in mice testis and its suppression interferes with testosterone production, causing sperm maturation defects.

With the emergence and use of NSAIDs with preferential action on COX-2 such as meloxicam in horses and conflicting results of the action on reproductive function and semen quality in stallions treated with different NSAIDs, the aim of the present study was to investigate the influence of meloxicam on total prostaglandin concentration in seminal plasma as well as on semen quality. Ketoprofen, an unspecific inhibitor of COX, was used as a positive control. Furthermore, the role of COX 1 and 2 and prostaglandins in the reproductive tract of horses has not yet been fully elucidated.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

The experiment was conducted using 6 healthy Brazilian Pony stallions. The ponies were 5 to 10 years old and were kept on pasture and supplemented with oats and had free access to water. Before starting the experiment, the ponies were trained for semen collection and sperm reserves were reduced by daily collections during 5 days. The animals were divided into 3 groups with 2 animals each. The experiment was repeated 3 times with an average interval of 8 months, so that all animals were evaluated in all groups, making a total n of 18. A group (n=6) was treated with therapeutic doses of 0.6 mg/kg/day meloxicam PO, another group (n=6) was given 2.2 mg/kg/day ketoprofen PO (positive control) during 30 days. The last group (n=6) was the negative control and received no medication. Semen was collected and evaluated (2x/week) before treatment (week 0), during treatment (1 to 4 weeks) and up to 80 days (5 to 15 weeks) after treatment was

finished. The average weekly values from each animal were used to tabulate the data. From all ejaculates collected before (week 0) during (1 to 4 weeks) and after treatment (week 5 and 15) a 5 ml aliquot was taken and centrifuged (2400 x g, 5 min) and the seminal plasma separated and frozen (- 80 °C) for prostaglandin analysis.

2.2. Semen evaluation

After semen collection, the total volume was measured and the gel free fraction was separated and graduated. Sperm motility and vigor was estimated at 250x magnification, evaluating several fields per slide. Sperm concentration was determined on a hematology chamber (Neubauer). Plasma membrane integrity (sperm viability) was evaluated on semen smears stained by eosin. Functional membrane integrity was assessed by the HOS test according to Lagares et al. (1999). Sperm morphology was evaluated on semen smears stained by Cerowsky. Two hundred spermatozoa were evaluated and changes of acrosome, head, neck, middle piece and tail tabulated.

2.3. Prostaglandin levels assay

Total PGs in seminal plasma samples were quantified using an enzyme immune assay kit (Cayman kit cat no. 514012). This assay is an acetylcholinesterase (AChE) competitive enzyme assay.

2.4. Statistical analysis

The assessment of treatment effects on sperm variable was performed as repeated measures data and analyzed using the MIXED procedure with a repeated measure statement. Main effects of treatment group, time of semen collection and their interaction were determined. Differences between sperm variable at a specific time point were compared between groups using estimates. All analyses were performed using SAS software package (SAS Institute Inc., Cary, NC). Results are presented as means ± standard error of the mean (SEM). A P<0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Total prostaglandin levels

The seminal plasma collected during treatment showed a significant ($P<0.05$) effect of treatment on total PGs concentration. Mean PGs (Fig. 1) concentration in the meloxicam group was 91.463 pg/ml, in the ketoprofen group 122.782 pg/ml and in the control group 118.012 pg/ml.

3.2. Semen characteristics

The amount of viable sperm, tail defects and HOS positive spermatozoa was significantly ($P> 0.05$) influenced by treatment (Table. 1). Semen from meloxicam treated ponies had significantly ($P<0.05$) higher non viable (eosin stained) spermatozoa and sperm tail defects on week 5, 6, 9, 11 and week 6, respectively (Figs. 2-3). The meloxicam treated ponies had less ($P<0.05$) HOS positive sperm than other groups at weeks 6 and 7 (Fig. 4). In an intra group analysis, the meloxicam treated animals showed a significant difference ($P <0.05$) of HOS positive spermatozoa between week 0 (pretreatment) and weeks 4, 8, 10, 11, 12 and 14. There also was a difference between week 1 and weeks 6 and 7. The week at which collection took place had a significant effect ($P< 0.05$) on neck changes (Fig. 5). There was no difference of any evaluated variable between ketoprofen treated and negative control group.

4. Discussion

Prostaglandin analysis in seminal plasma during treatment showed that total PG concentration was significantly lower in meloxicam treated ponies than in ketoprofen treated or control stallions. This finding is most likely the result of the inhibitory effect of meloxicam on COX-2 activity, which is known to be constitutively produced in mice testis and vas deferens (Balaji et al., 2007a,b) with higher levels in vas deferens than in other reproductive organs (McKenna et al., 1998). The function of PGs in seminal plasma of stallion is still unknown. Treatment of 3 stallions with 1 g phenylbutazone twice daily during 4 weeks did not influence the quality of fresh and cooled semen (McDonnell et al.,

1992), although PG-metabolite concentrations in seminal plasma were reduced by daily treatment with 3 g phenylbutazone during 24 days (Larson et al., 1986). Vedaprofen caused decreased PGE and PGF, but also had no effect on sperm quality. It may be concluded that low PG values are not detrimental to stallion semen quality (Janett et al., 2005). On the other hand, in our study we found decrease of total PG in meloxicam treated stallions with increased sperm membrane integrity damage (unviable sperm) and decreased functional membrane integrity in addition to increased tail defects. This may be associated with inhibition of COX-2, since the inhibition of COX-2 by nimesulide, that has a similar action to meloxicam, caused a decrease of total PGs with a consequent decrease in sperm motility and fertility in mice (Balaji et al., 2007b). Thus, one can conclude that COX-2 also has an important physiological function in the reproductive tract of stallions. The difference of vedaprofen may be due to treatment duration, since vedaprofen is considered a COX-2 preferential inhibitor. Another possibility is that meloxicam may have a stronger COX-2 inhibitory effect than vedaprofen in horses.

Prostaglandins may have their main function in the female reproductive tract, so that a decrease in their production may impair fertility. It has been shown that mice treated with nimesulide, an NSAID with preferential action on COX-2 suffered severe reduction in motility and fertility (family size) which may be associated with an interference in sperm capacitation (Balaji et al., 2007b). Little is known about the relationship between subfertility and seminal PGs in the stallion. The PGE may facilitate transport of spermatozoa through the uterine tubal junction, but the experiment needs to be repeated using a larger sample size in order to be conclusive (Troedsson et al., 2005). The addition of exogenous PGE to semen has been shown to improve fertility in both equine (Woods et al., 2000) and human studies (Brown et al., 2001). In contrast, no effect was seen on pregnancy rates when PGE was administered on the uterine-tubal papilla 2 h prior to insemination (Brinsko et al., 2003). After inactivation of most PGs in seminal plasma, a strong fall in sperm motility has been found in men (Schlegel et al., 1981) and rabbits (Schlegel et al., 1983). Moreover, a selective inactivation of PGE and PGF_{2α} through specific antisera resulted in lower and higher motility, respectively, but fertility rate was consistently reduced (Schlegel et al., 1983). Whether the low total PG concentration in

seminal plasma during meloxicam treatment seen in our study may compromise fertility in the mare is not known and needs further research.

Meloxicam did not decreased motility but caused a decrease of sperm plasma membrane integrity and of functional membrane integrity. These changes may be associated with an inhibition of COX-2 and consequent decrease of PGs in both, seminal plasma and stallion reproductive tissues. One important pre-requisite for capacitation is influx of Ca^{2+} ions into sperm which alters membrane permeability by efflux of cholesterol and phospholipids (Darzon et al., 2005; Alexander et al., 2002; Manjunath and Therien, 2002). To induce this Ca^{2+} influx, PGs are necessary (Wong et al., 1999) and they are secreted and ejaculated in the seminal fluid along with sperm to alter the membrane permeability and aid in fusion of outer acrosomal membrane and sperm plasma membrane (Mitra and Shivaji, 2003). Sperm plasma membrane is a typical phospholipid bilayer incorporating cholesterol, complex carbohydrates, and proteins. Cholesterol likely serves as a membrane-stabilizing substance (Langlais and Roberts, 1985). A supposed interference on sperm maturation or spermatogenesis by meloxicam could cause disturbance in membrane-stabilizing, because the administration of the preferential COX-2 inhibitor nimesulide over a period of time interferes with spermatogenesis. This is due to accumulation of arachidonic acid, which in turn affects testosterone synthesis leading to defective sperms (Balaji et al., 2007a). Meloxicam caused an increase in tail defects only at week 6, but coincided with the weeks in which spermatozoa showed membrane defects. Nevertheless, the amount of observed effects that may affect fertility of healthy stallions is not known and needs more research. Although it is important to monitoring stallions that already have poor semen quality and are being treated with COX-2 selective NSAIDs.

Unlike meloxicam, ketoprofen is a major inhibitor of COX-1 and caused no effect on semen quality. These data are consistent with McDonnell et al. (1992) that found no effect on the quality of fresh or cooled semen when treating 3stallions with 1 g of phenylbutazone twice daily for 4 weeks. It is shown that COX-2 has a central role in the synthesis of steroid hormones, whereas the role of COX-1 is maintenance of tissue homeostasis (Cheuk et al., 2000).

It can be concluded that meloxicam, a preferential COX-2 inhibitor administered at the recommended dose once daily for 30 days, decreased total PG concentration and had a

negative influence on the semen quality of pony stallions. Thus it is possible that COX-2 has an important constitutive role in the reproductive tract of stallions.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Balaji, T., Ramanathan, M., Menon, V.P., 2007a. Localization of cyclooxygenase-2 in mice testis and assessment of its possible role through suppressing its expression using nimesulide: a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 76, 341-348.
- Balaji, T., Ramanathan, M., Menon, V.P., 2007b. Localization of cyclooxygenase-2 in mice vas deferens and effects on fertility upon suppression using nimesulide – A preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. *Toxicology* 234, 135-144.
- Beretta, C., Garavaglia, G., Cavalli, M., 2005. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: An in vitro analysis. *Pharm. Res.* 52, 302-306.
- Botting, R.M., 2006. Cyclooxygenase: past, present and future a tribute to John R. Vane (1927-2004). *J. Therm. Biol.* 34, 208-219.
- Brideau, B., Van Staden, C., Chi, C.C., 2001. In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1755-1760.

- Brinsko, S.P., Rigby, S.L., Lindsey, A.C., Blanchard, T.L., Love, C.C., Varner, D.D., 2003. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology* 59, 1001-1009.
- Brown, S.E., Torner, J.P. Schnorr, J.A., Williams, S.C., Ziegler, G.B., Oehninger, S., 2001. Vaginal misoprostol enhances intrauterine insemination. *Hum. Reprod.* 6, 96-101.
- Colon, J., Ginsburg, F., Lessing, J., Schoenfeld, C., Goldsmith, L.T., Amelar, R.D., Dublin, L., Weiss, G., 1986. The effect of relaxin and prostaglandin E2 on the motility of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 46, 1133-1139.
- Cheuk, B.L.Y., Leung, P.S., Lo, A.C.T., Wong, P.Y.D., 2000. Androgen control of cyclooxygenase expression in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 63, 775-780.
- Cheuk, B.L.Y., Chew, S.B.C., Fiscus, R.K., Wong, P.Y.D., 2002 Cyclooxygenase-2 regulates apoptosis in rat epididymis through prostaglandin D2. *Biol. Reprod.* 63, 775-780.
- Cryer, B., Dubois, A., 1998. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase – a review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 56, 341-361.
- Darzon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Trevino, C.L., Felix, R., Beltran, C., 2005. Calcium channel and Ca 2+ in sperm physiology. *Int. Rev. Cytol.* 243, 79-172.
- Gibb, W., Sun, M., 1996. Localization of prostaglandin H synthase type 2 protein and mRNA in term human fetal membranes and decidua. *J. Endocrinol.* 150, 497-503.
- Gross, G., Imanur, T., Vogt, S.K., 2000. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation mediated pre-term labour in the mouse. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, 1415-1423.

- Janett, F., Aebi, L., Burger, D., Imboden, I., Hässig, M., Kindahl, H., Thun, R., 2005. Influence of vedaprofen (Quadrisol) on quality and freezability of stallion semen. Theriogenology. 64, 1867-1877.
- Jones, C.J., Budsberg S.C., 2000. Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 217, 721-729.
- Kirschenbaum, A., Liotta, D.R., Yao, S., Xin-Hua, L., Klausner, A.P., Unger, P., Shapiro, E., Leau, I., Levine, A.C., 2000. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85, 3436-3441.
- Lagares, M.A., Petzoldt, R., Sieme, H., Klug, E., 1999. Assessing equine sperm-membrane integrity. Andrologia. 32, 163-167.
- Langlais, I.; Roberts, K., 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Research 12, 183-224.
- Larson, R.E., Archbald, L.F., Chen, C.L., Gronwall, R.R., Collier, J.L., Asbury, A.C., Thatcher, W.W., 1986. Concentration of phenylbutazone and 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂F (PGFM) in blood and seminal plasma of stallions treated with phenylbutazone. Theriogenology. 25, 659-665.
- Lazarus, M., Munday, C.J., Eguchi, N., Matsumoto, S., Killian, G.J., Kubata, B.K., Urade, Y., 2002. Immunohistochemical localization of microsomal PGE syntase-1 and cyclooxygenases in male mouse reproductive organs. Endocrinology. 143, 2410-2419.
- Lazarus, M., Eguchi, N., Matsumoto, S., Nagata, N., Yana, T., Killian, G.J., Urade, Y., 2004. Species specific expression of microsomal Prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenases in male monkey reproductive organs. Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids. 71, 233-240.

- Manjunath, P., Therien, I., 2002. Role of seminal plasma phospholipids binding protein in sperm membrane lipid modification that occur during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53, 109-119.
- MacAllister, C., 1994. Nonsteroidal of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Vet. Med.* 89, 237-804.
- Mc Donnell, S.M., Love, C.C., Pozor, M.A., Diehl, N.K., 1992. Phenylbutazone treatment in breeding stallion: preliminary evidence for no effect on semen or testicular size. *Theriogenology* 37, 1225-1232.
- McKenna, J.A., Zhang, M.Z., Wang, J.L., Cheng, H.F. Harris, R.C., 1998. Constitutive expression of cyclooxygenase-2 in rat vas deferens. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275, 227-233.
- Mintra, K., Shivaji, S., 2003. Proteins implicated in sperm capacitation. *Indian J. Exp. Biol.* 43, 1001-1015.
- Monjazeb, A.M., High, K.P., Koumenis, C., Chilton, F.H., 2005. Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cell. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 463-464.
- Neeraja, S., Sreenath, A.S., Reddy, P.R.K., Reddanna, P., 2003. Expression of cyclooxygenase-2 in rat testis. *Reprod. Biomed. Online* 6, 300-307.
- Wong, P.Y.D., Chan, H.C., Leung, P.S. Chung, Y.W., Wong, Y.L., Lee, W.M., Ng, V., Dun, N.J., 1999. Regulation of anion secretion by cyclooxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from rat. *J. Physiol.* 514, 809-820.
- Schlegel, W., Rotermund, S., Faber, G., Nieschlag, E., 1981. The influence of prostaglandins on sperm motility. *Prostaglandins* 21, 87-89.

- Schelegel, W., Fischer, B. Beier, H.M., Schneider, H.P., 1983. Effects on fertilization of rabbits of insemination with PG-dehydrogenase and antisera to PGE2 and PGF2a. *J. Reprod. Fert.* 68, 45-50.
- Shafiq, N., Malhotra, S., Pandhi, P., 2004. Comparison of non selective cyclooxygenase (Cox) inhibitors and selective cox-2 inhibitors on preimplantation loss, post implantation loss and duration of gestation: an experimental study. *Contraception* 69, 71-75.
- Shimizu, Y., Yorimitsu, A., Maruyama, T., Kubota, T. Aso, T., Bronson, R.A., 1998. Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 555-561.
- Simmons, D.L., Botting, M.R., Timoth, H.L.A., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandins synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56, 387-437.
- Toutain, P., Reymond, N., Laroute, V., Garcia, P. Popot, M.A., Bonnaire, Y., Hirsch, A., Narbe, R., 2004a. Pharmacokinetics of meloxicam in plasma and urine of horses. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1542-1547.
- Toutain, P.; Cester, C.C., 2004b. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal joint. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1533-1541.
- Travis, A.J., Kopf, G.S., 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest.* 110, 731-736.
- Troedsson, M.H.T., Desvouges, A., Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C.A., Hayana, J., Valesco, R., Collahan, P.T., Macpheron, M.L., Pozor, M., Buhi, W.C., 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 171-186.

Vidament, M., Cognard, E., Yvon, J-M., Sattle, R.M., Palmer, E., Magistrini, M., 1998. Evaluation of Stallion Semen Before and After Freezing. *Reprod. Dom. Anim.* 33, 271-277.

Vane, J.R., Botting, R.M., 1998. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. Res.* 47, 78-87.

Woods, J., Rigby, S., Brinsko, S., Stephens, R., Varner, D.D., Blanchard, T.L., 2000. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E2 prior to insemination of mares in the uterine horn or body. *Theriogenology* 53, 1827-1836.

Wong, P.Y.D., Chan, H.C, Leung, P.S, Chung, Y.W., Wong, Y.L., Lee, W.M., Ng, V., Dun, N.J., 1999. Regulation of anion secretion by cyclooxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from rat. *J. Physiol.* 514, 809-820.

Table 1. Seminal parameters from weekly collected ejaculates during 16 weeks in meloxicam or ketoprofen treated and control (none treated) stallions (n=6 each) and effect of treatment, time of semen collection and interactions between treatment and time.

Seminal parameters	Treatment	Time	Interaction
	(P)	(P)	(P)
Gel free volume (ml)	0.7648	0.2525	0.9995
Concentration ($\times 10^6$ mL)	0.1937	0.1232	0.9872
Total motility (%)	0.2347	0.6718	0.1792
Vigor (0-5)	0.4364	0.1776	0.9371
Nonviable cells (%)	0.0027*	0.4565	0.7793
Acrosome defects (%)	0.7043	0.7952	0.9873
Head defects (%)	0.6681	0.3910	0.9942
Neck defects (%)	0.0855	0.0001*	0.4966
Middle piece defects (%)	0.1288	0.6692	0.9735
Tail defects (%)	0.0013*	0.4895	0.8149
HOS fresh semen (%)	0.0403*	0.7363	0.7966

* Significant ($P < 0.05$).

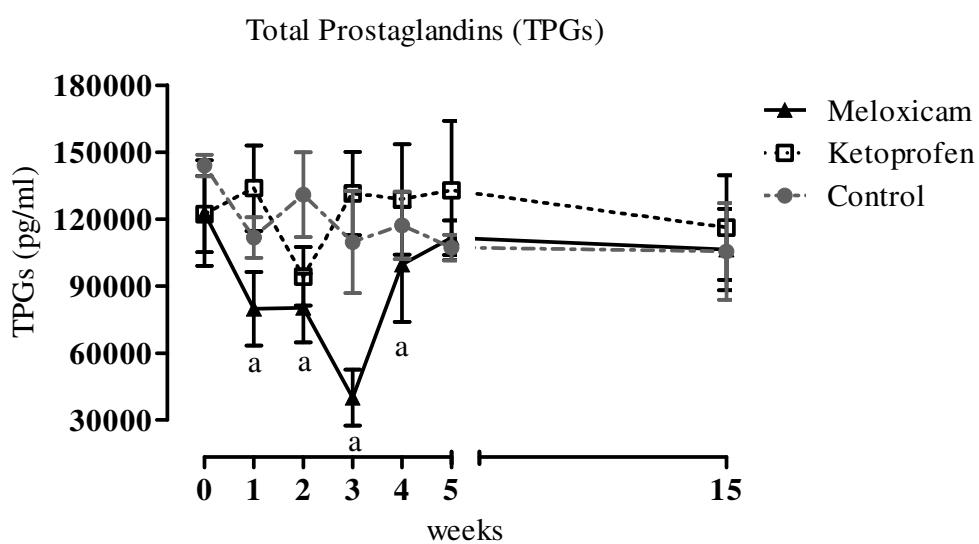


Fig. 1. Means \pm SEM of seminal plasma TPGs concentrations in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1 to 4), one (week 5) and 10 weeks (week 15) after ended treatment. Letter "a" indicates significant difference of meloxicam with others groups.

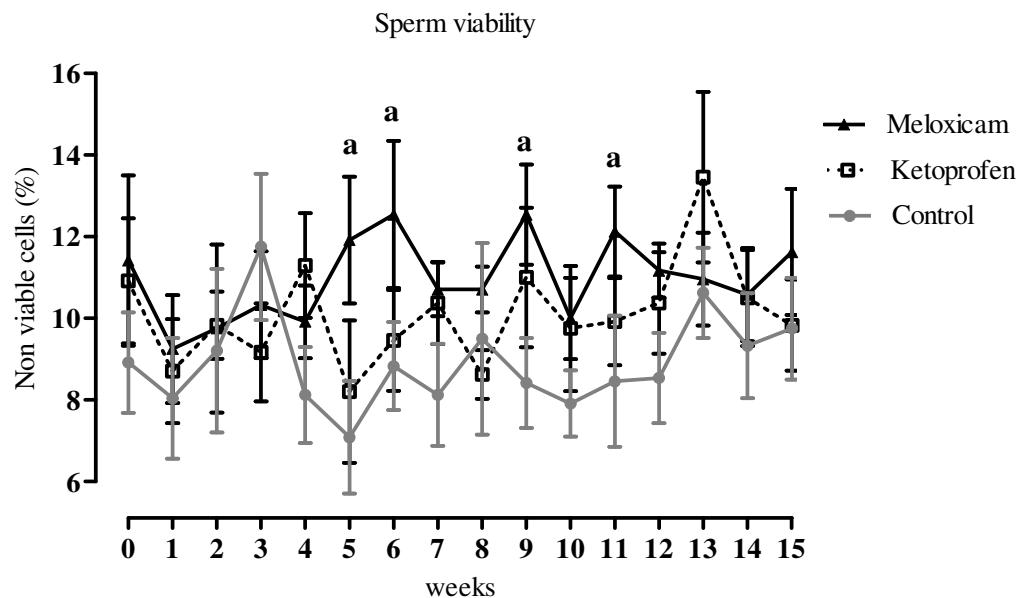


Fig.2. Means \pm SEM of non viable sperm (eosin stained) in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1-4) and after (weeks 5-15) ended treatment. Letter "a" indicates significant difference of meloxicam with others groups.

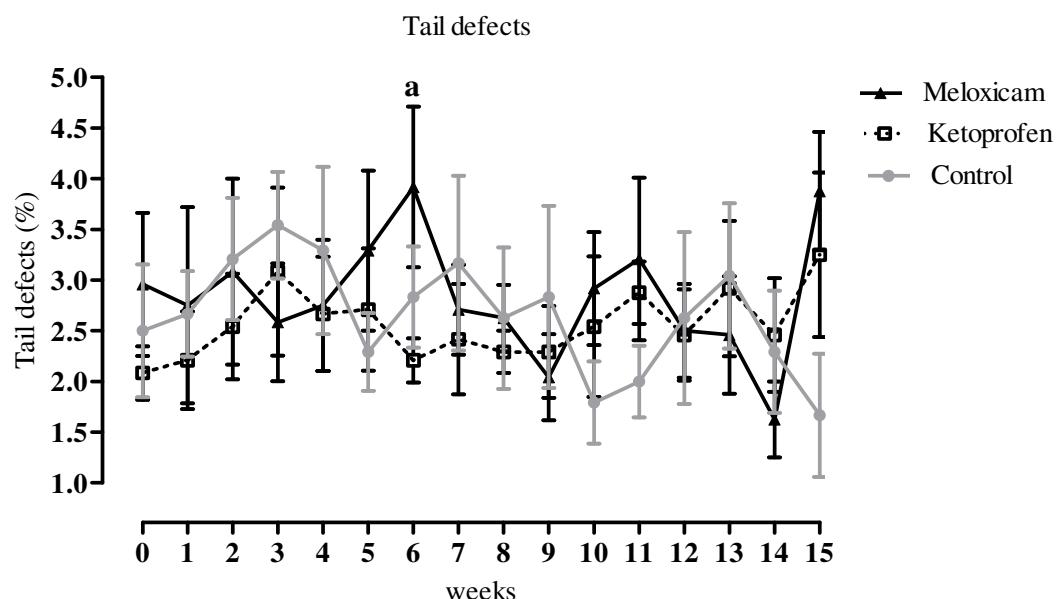


Fig.3. Means \pm SEM of tail defects sperm in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1-4) and after (weeks 5-15) ended treatment. Letter "a" indicates significant difference of meloxicam with others groups.

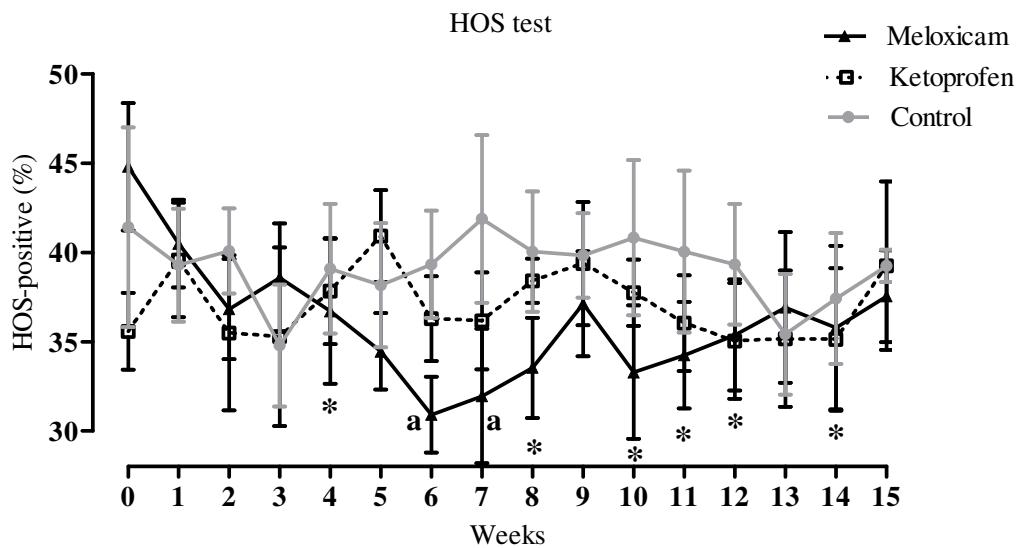


Fig.4. Means \pm SEM of HOS positive sperm in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1-4) and after (weeks 5-15) ended treatment. Letter "a" indicates significant difference of meloxicam with others groups and (*) indicates significant difference of week 0 intra group.

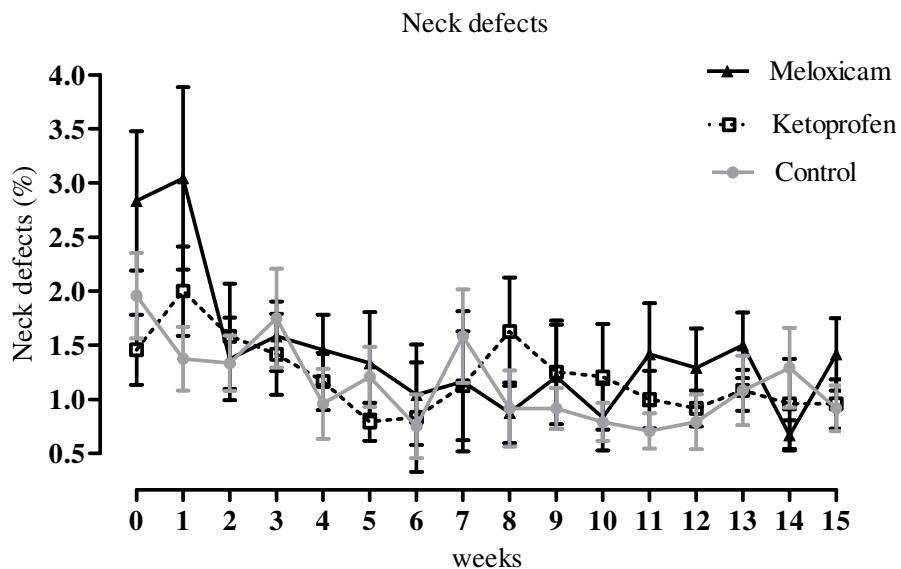


Fig.5. Means \pm SEM of neck defects sperm in stallions (n=6 each) treated with meloxicam, ketoprofen or without treatment (control) before (week 0), during (weeks 1-4) and after (weeks 5-15) ended treatment.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os anti-inflamatórios não esteroidais são os fármacos mais utilizados tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Na clínica eqüina eles são utilizados para várias doenças dolorosas e febris, como nas sinovites, osteoartrites, laminite e nos casos de cólica. Em muitos destes casos muitas vezes é necessário um tratamento prolongado e em diferentes categorias de equinos, como garanhões, que podem estar em treinamento ou até mesmo em reprodução. Como descrito neste trabalho, dependendo do tipo de AINE utilizado, os tratamentos prolongados podem prejudicar a qualidade seminal, e desta forma os garanhões requerem acompanhamento constante. Os efeitos sobre a fertilidade de garanhões ainda são desconhecidos, mas naqueles com uma qualidade de sêmen inferior, um maior cuidado é necessário quando necessitam de um tratamento prolongado com AINEs. O efeito tóxico do meloxicam sobre o sêmen parece ser mais devido a inibição da cicloxigenase 2, o que sugere um importante papel fisiológico desta enzima no tecido reprodutivo de garanhões. Este fármaco é o único AINE que inibe preferencialmente a COX-2 no Brasil, porém outros AINEs mais seletivos (coxibes) estão sendo testados cada vez mais em cavalos. Estes fármacos têm um uso promissor na espécie eqüina, principalmente devido ao baixo índice de lesões na mucosa do trato gastrointestinal, o que possibilita seu uso em casos de cólica. Porém como a COX-2 não tem exclusivo caráter inflamatório, a utilização destes AINEs também requer certo cuidado.

O importante a ser ressaltado é que cada AINE deve ser prescrito conforme a doença que o eqüino apresenta, ou seja, cada AINE terá uma eficácia diferente em cada caso. Isto está diretamente relacionado a inibição de COX e a farmacocinética. A farmacocinética pode ser alterada por quadros de inflamação local como na sinovite e varia conforme o tamanho do eqüino e condição do trato gastrointestinal no caso de formulações orais. Estes aspectos devem ser levados em conta durante a prescrição de tratamento com AINEs.

Como evidenciado neste trabalho, o tratamento por 30 dias tanto com meloxicam como com cetoprofeno, não interferiram nos parâmetros de coagulação e hematológicos. Isto justificaria seu uso em doenças onde é necessário um tratamento prolongado. No caso de doenças que afetam o sistema cardiovascular, caracterizadas principalmente por inflamação do endotélio e desenvolvimento de micro trombos de plaquetas e plaquetas com neutrófilos, que tem ligação direta com o sistema de coagulação, um acompanhamento clínico rigoroso é necessário. É importante ressaltar que cada paciente pode responder de forma diferente ao tratamento com determinado AINE.

7. REFERÊNCIAS

ALENCAR M, M. A. et al., Margem de segurança do meloxicam em cães: efeitos deletérios nas células sanguíneas e trato gastrintestinal. **Ciência Rural**. v.33, p.525-532, 2003.

ALLYN, M.; JOHNSTON, S. The gastroduodenal effects of buffered aspirin, carprofen, and etorlac in the dog. **ANNUAL ACVIM VETERINARY MEDICAL FORUM**, 16., 1998, San Diego. **Proceedings**... San Diego: ACVIM, 1998, p.731.

BALAJI, T.; RAMANATHAN, M.; MENON, V. P. Localization of cyclooxygenase-2 in mice testis and assessment of its possible role through suppressing its expression using nimesulide: a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 76, p. 341-348, 2007.

BALAJI, T.; RAMANATHAN, M.; MENON, V. P. Localization of cyclooxygenase-2 in mice vas deferens and effects on fertility upon suppression using nimesulide – A preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. **Toxicology**. v. 234, p. 135-144, 2007.

BELUCHE, L. A. et al. Effects of oral administration of PBZ to horses on in vitro articular cartilage metabolism. **American Journal of Veterinary Research**. v. 62, p. 1916-1921, 2001.

BENNETT, J. S. et al. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Circulation**, v. 111, p. 1713-716, 2005.

BERETTA, C.; GARAVAGLIA, G.; CAVALLI, M. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: An in vitro analysis. **Pharmacological Research.** v. 52, 302-306, 2005.

BETLEY, M. et al. The analgesic effect of ketoprofen for use in treating equine colic as compared to flunixin meglumine. **Equine Practice.** v. 13, p.11-16, 1991.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: past, present and future a tribute to John R. Vane (1927-2004). **Journal of Thermal Biology.** v. 34, 208-219, 2006.

BRIDEAU, B. et al. In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats. **American Journal of Veterinary Research.** v. 62, p. 1755-1760, 2001.

BRINSKO, S. P. et al. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. **Theriogenology** v. 59, 1001-1009, 2003.

BRINK, P. et al. Stereospecific pharmacokinetics of free and protein-bound ketoprofen in serum and synovial fluid of horses after IV and IM administration. **American Journal of Veterinary Research.** v. 59, p. 739-743, 1998.

BROWN, S. E. et al. Vaginal misoprostol enhances intrauterine insemination. **Human Reproduction.** v. 6, 96-101, 2001.

BUSCH, U.; ENGELHARDT, G. Distribution of [14C] meloxicam in joints of rats with adjuvant arthritis. **Drugs Experimental of Clinical Research.** v. 16, p. 49-52, 1990.

BUSCH, U., et al. Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. **Drugs Metabolism and Disposition.** v. 26, p. 576-584, 1998.

BUDSBERG, S. C. et al. Evaluation of intravenous administration of meloxicam for perioperative pain management following stifle joint surgery in dogs. **American of Journal Veterinary Research.** v. 63, p. 1557-1563, 2002.

CARVALHO, A. C. A. Hemostasis and thrombosis. In: Schiffman F.J. **Hematologic pathophysiology.** Philadelphia: Lippincott-Raven. P.161-244, 1998.

CHEER, S. M.; GOA, K. L. Parecoxib (parecoxib sodium). **Drugs.** v. 61, p. 1133-1141, 2001.

CHEUK, B. L. Y. et al. Androgen control of cyclooxygenase expression in the rat epididymis. **Biology of Reproduction.** v. 63, p. 775-780, 2000.

CHEUK, B. L. Y. et al. Cyclooxygenase-2 regulates apoptosis in rat epididymis through prostaglandin D2. **Biology of Reproduction.** v. 63, p. 775-780, 2002.

COOK, V. L. et al. Effect of firocoxib or flunixin meglumine on recovery of ischemic-injured equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research.** v. 70, p. 992-1000, 2009.

COHEN, N. et al. The recognition and medical management of right dorsal colitis in horses. **Veterinary Medicine.** v.90, p.687-691, 1995.

COLLINS, L. G.; TYLER, D. E. Experimentally induce phenylbutazone toxicosis in ponies: description of the syndrome and its prevention with synthetic prostaglandin E2. **American Journal of Veterinary Research.** v.46, p.1605-1615, 1985.

COLON, J. et al. The effect of relaxin and prostaglandin E2 on the motility of human spermatozoa. **Fertil. Steril.** v. 46, p. 1133-1139, 1986.

CROSS, A. R.; BUDSBERG, S. C.; KEEFE, T. J. Kinetic gait analysis assessment of meloxicam efficacy in a sodium urate-induced synovitis model in dogs. **American of Journal Veterinary Research.** v. 58, p. 626-631, 1997.

CRYER, B.; DUBOIS, A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase – a review. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators.** v. 56, p. 341-361, 1998.

CURRY, S.; COGAR, S.; COOK, J. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: a review. **Journal of the American Animal Hospital Association.** v. 41, p.298-309, 2005.

DARZON, A. et al. Calcium channel and Ca 2+ in sperm physiology. **Internal Review of Cytology.** v. 243, p. 79-172, 2005.

DING, C.; JONES, G. Lumiracoxib (Novartis). **Drugs.** v. 5, p. 1168-1172, 2002.

DOIG, P. A. et al. Clinical efficacy of meloxicam in dogs with chronic osteoarthritis. **Canadian of Veterinary Journal.** v. 41, p. 296-300, 2000.

DOUCET, M. Y. et al. Comparison of efficacy and safety of paste formulations of firocoxib and phenylbutazone in horses with naturally occurring osteoarthritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 232, p. 91-97, 2008.

ENGELHART, G. et al. Antiinflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new nonsteroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. **Inflammation Research.** v. 44, p. 423-433, 1995.

EMGELHART, G. Pharmacology of meloxicam, a new nonsteroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. **British Journal of Rheumatology.** v. 35, p. 4-12, 1996.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. **The New England Journal of Medicine.** v. 345, p. 433-442, 2001.

FOX, S. M.; CAMPBELL, S. Atualização: dois anos (1997-1998) de experiência clínica com rimadyl®. **Pfizer Saúde Animal-Boletim Técnico**, v. 1, 200, p. 4-6, 2000.

FREAN, S. P.; CAMBRIDGE, H.; LEES, P. Effects of anti-arthritic drugs on proteoglycan synthesis by equine cartilage. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v. 25, p. 289-298, 2002.

FRESNO, L. et al. Effects of preoperative administration of meloxicam on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time, and haematological indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. **The Veterinary Journal.** v. 170, p. 138-140, 2005.

FRIES, J. F. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The New England Journal of Medicine.** v. 341, p. 1397-1398, 1999.

FRONZA, M. et al. Evaluation of the changes on hemostatic parameters induced by valdecoxib in male Wistar rats. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia.** v. 28, p. 28-32, 2006.

GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; JICK, H. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet.** v. 343, p. 769-772, 1994.

GIBB, W.; SUN, M. Localization of prostaglandin H synthase type 2 protein and mRNA in term human fetal membranes and decidua. **Journal of Endocrinology.** v. 150, p. 497-503, 1996.

GRETZER, B. et al. Effects of specific inhibition of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the rat stomach with normal mucosa and after acid challenge. **British Journal of Pharmacology.** v. 132, p. 1565-73, 2001.

GROSS, G.; IMANUR, T.; VOGT, S. K. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation mediated pre-term labour in the mouse. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.** v. 278, p. 1415-1423, 2000.

HAMBLETON, J.; LEUNG, L. L.; LEVI, M. Coagulation: consultative hemostasis. **Hematology.** p.335-352, 2002.

HIPPISEY-COX, J.; COUPLAND, C. Risk of myocardial infarction in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroid anti-inflammatory drugs: population based nested case-control analysis. **British Journal of Medicine.** v. 330, p. 1366-1372, 2005.

HOOD, D. M. et al. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v. 7, p. 228-234, 1993.

HOPPER, K.; BATEMAN, S. An updated view of hemostasis: mechanisms of hemostatic dysfunction associated with sepsis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.** v.15, p.83-91, 2005.

JACKMAN, B. R et al. Comparison of the effects of ketoprofen and flunixin meglumine on the in vitro response of equine peripheral blood monocytes to bacterial endotoxin. **Canadian Journal of Veterinary Research.** v.58, p.138-143, 1994.

JANETT, F. et al. Influence of vedaprofen (Quadrisol) on quality and freezability of stallion semen. **Theriogenology.** v. 64, p. 1867-1877, 2005.

JONES, C. J.; BUDSBERG S. C. Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.217, p.721-729, 2000.

KAZAKOS, G. M. et al. Effects of meloxicam on the haemostatic profile of dogs undergoing orthopaedic surgery. **The Veterinary Record.** v. 157, p. 444-446, 2005.

KIRSCHENBAUM, A. et al. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 85, p. 3436-3441, 2000.

KURUMBAIL, R. G. et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature.** v. 384, p. 644-648, 1996.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J. et al. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **Journal of the Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v. 30, p. 208-217, 2007.

LAGARES, M. A., PETZOLDT, R., SIEME, H., KLUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia.** v. 32, p. 163-167, 1999.

LANDONI, M. F.; LEES, P. Comparison of the anti-inflammatory actions of flunixin and ketoprofen in horses applying PK/PD modeling. **Equine Veterinary Journal.** v. 27, p. 247-256, 1995a.

LANDONI, M. F.; LEES, P. Influence of formulation on the pharmacokinetics and bioavailability of racemic ketoprofen in horses. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics.** v. 18, p. 446-450, 1995b.

LANGLAIS, I.; ROBERTS, K. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Research.** v. 12, p. 183-224, 1985.

LANZA, F. L. A review of gastric ulcer and gastroduodenal injury in normal volunteers receiving aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Scandinave Journal of Gastroenterology.** v. 24, p. 24-31, 1989.

LARSON, R. E. et al. Concentration of phenylbutazone and 13-14-dihydro-15-keto-PGF2F (PGFM) in blood and seminal plasma of stallions treated with phenylbutazone. **Theriogenology.** v. 25, p. 659-665, 1986.

LAZARUS, M. et al. Immunohistochemical localization of microsomal PGE syntase-1 and cyclooxygenases in male mouse reproductive organs. **Endocrinology.** v. 143, p. 2410-2419, 2002.

LAZARUS, M. et al. Species specific expression of microsomal Prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenases in male monkey reproductive organs. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.** v. 71, p. 233-240, 2004.

LEES, P. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of meloxicam in the horse. **British Veterinary of Journal.** v. 147, p. 97-108, 1991.

LEES, P.; HIGGINS, A. J. Clinical pharmacology and therapeutic uses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the horse. **Equine Veterinary Journal.** v. 17, p. 83-96, 1985.

LEMKE, K. A.; RUNYON, C. L.; HORNEY, B. S. Effects of preoperative administration of ketoprofen on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time, and haematological indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 220, p. 1818-1822, 2002.

LEVI, M.; ten CATE, H.; van der POLL, T. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. **Critical Care Medicine.** v. 30, p. 220-224, 2002.

LITTLE, D. et al. Effects of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on recovery of ischemia-injured equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research.** v. 68, p. 614-624, 2007.

LIVINGSTON, A. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Veterinary Clinical of North American: Small Animal Practice.** v. 18, p. 21-37, 2002

MacALLISTER, C. G. Effects of toxic doses of phenylbutazonne in ponies. **American Journal of Veterinary Research.** v. 44, p. 2277-2279, 1983.

MacALLISTER, C. Nonsteroidal of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Veterinary Medicine.** v. 89, p. 237-240, 1994.

MacALLISTER, C. G. et al. Comparison of adverse effects of phenylbutazone, flunixin meglumine, and ketoprofen in horses. **The Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 202, p. 71-77, 1993

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids binding protein in sperm membrane lipid modification that occur during capacitation. **Journal of Reproduction Immunology.** v. 53, p. 109-119, 2002.

MAY, S. A.; LEES, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: McIlwraith, C. W.; Trotter, G. T. **Joint Disease in the Horse.** Saunders, Philadelphia, p. 223-237, 1996.

Mc DONNELL, S. M. et al. Phenylbutazone treatment in breeding stallion: preliminary evidence for no effect on semen or testicular size. **Theriogenology.** v. 37, p. 1225-1232, 1992.

McKANNA, J. A. et al. Constitutive expression of cyclooxygenase-2 in rat vas deferens. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.** v. 275, p. 227-233, 1998.

MEADE, E. A. et al. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Biology Chemistry.** v. 268, p. 6610-6614, 1993.

MITRA, K.; SHIVAJI, S. Proteins implicated in sperm capacitation. **Indian Journal of Experimental Biology.** v. 43, p. 1001-1015, 2003.

MONJAZEB, A. M. et al. Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cell. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.** v. 73, p. 463-464, 2005.

MUIR, W. Recognizing and treating pain in horses. In: Reed, S. et al. **Equine internal medicine.** St. Louis: Saunders, 2004. Cap. 22, p. 1529-1541

MURRAY, M. J. et al. Factors associated with gastric lesions in thoroughbred race horses. **Equine Veterinary Journal.** v. 28, p.368-374, 1996.

MURRAY, M. J. Diseases of the stomach. In: MAIR, T., DIVERS, T., DUCHARME, N. (Eds), **Manual of Equine Gastroenterology.** WB Saunders, London, UK, 2002, p. 241-265.

NEERAJA, S. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in rat testis. **Reproduction Biomedical Online.** v. 6, p. 300-307, 2003.

NOBLE S.; BALFOUR, J. A. Meloxicam. **Drugs,** v. 51, p. 424-430, 1996.

NUSSMEIER, N. A. et al. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. **The New England Journal of Medicine.** v. 352, p. 1081-1091, 2005

OWENS J. G et al. Effects of ketoprofen and phenylbutazone on chronic hoof pain and lameness in the horse. **Equine Veterinary Journal.** v. 27, p. 296-300, 1995.

OWENS, J. G.; KAMERLING, S. G.; BARKER, S. A. Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics.** v. 18, p. 187-195, 1995.

OWENS J. G. et al. Effects of pretreatment with ketoprofen and phenylbutazone on experimentally induced synovitis in horses. **American Journal of Veterinary Research.** v. 57, p. 866-874, 1996.

PATRIGNANI, P. et al. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v. 271, p. 1705-1710, 1994.

PANARA, M. et al. Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v. 290, p. 276-280, 1999.

PLUMB, D. Meloxicam. In: **Veterinary Drug Handbook**, 4 ed. Ames, IA. p. 490-491, 2002.

POZZOBON, R. et al. Efeito clínico do uso do parecoxib em modelo de sinovite induzida em pôneis. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences.** v.60, p.806-814, 2008.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EINARSSON, S. Influence of prostaglandins on the spontaneous motility of pig oviducts. **Animal Reproduction Science.** v. 8, p. 259-279, 1985.

RIENDEAU, D. et al. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v. 296, p. 558-566, 2001.

SAMS, R. A. Principles of drug disposition and drug interaction in horses. In: MUIR, W. W. & HUBBELL, J. A. E. **Monitoring and emergency therapy.** St. Louis: Mosby, 1991. Cap. 9. p. 180-198.

SCHNITZER, T. J. et al. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomized controlled trial. **Lancet.** v. 364, p. 665-674, 2004.

SCHLEGEL, W. et al. The influence of prostaglandins on sperm motility. **Prostaglandin.** v. 21, p. 87-89, 1981.

SCHELEGEL, W. et al. Effects on fertilization of rabbits of insemination with PG-dehydrogenase and antisera to PGE2 and PGF2a. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 68, p. 45-50, 1983.

SCOTT, M. A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. **Animal Reproduction Science.** v. 60, p. 337-348, 2000.

SHAFIQ, N.; MALHOTRA, S.; PANDHI, P. Comparison of non selective cyclooxygenase (Cox) inhibitors and selective cox-2 inhibitors on preimplantation loss, post implantation loss and duration of gestation: an experimental study. **Contraception.** v. 69, p. 71-75, 2004.

SHIMIZU, Y. et al. Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction.** v. 4, p. 555-561, 1998.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, M. R.; TIMOTH, H. L. A. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandins synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews.** v. 56, p. 387-437, 2004.

SODERLUND, W.; SODERLUND, P.; STROBEL, M., 2007. Non-steroidal anti-inflammatory oral powder and liquid preparations for administration to animals. Pharmaceutical Solutions, WO/2007/142707, 2007.

TANAKA, A. et al. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Physiology.** v. 95, p. 21-27, 2001.

TOUTAIN, P. et al. Pharmacokinetics of meloxicam in plasma and urine of horses. **American Journal of Veterinary Research.** v. 65, p. 1542-1547, 2004a.

TOUTAIN, P.; CESTER, C. C. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal joint. **American of Journal Veterinary Research.** v. 65, p. 1533-1541, 2004b.

TRAVIS, A. J., KOPF, G. S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **Journal of Clinical Investigation.** v. 110, p. 731-736, 2002.

TROEDSSON, M. H. T. et al. Smooth muscle electrical activity in the oviduct and the effect of oxytocin PGF_{2α}, and PGE2 on the myometrium and the oviduct of the cycling mare. **Biology Reproduction Mono 1 (Equine Reproduction VI)**, p. 439-452, 1995.

TROEDSSON, M. H. T. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science.** v. 89, p. 171-186, 2005.

Van der OUDERAA, F. J. et al. Acetylation of prostaglandin endoperoxide synthase with acetylsalicylic acid. **European Journal of Biochemistry**. v. 109, p. 1-8, 1980.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflammation of Research**. v. 44, p. 1-10, 1995.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation Research**. v. 47, p. 78-87, 1998.

VIDAMENT, M. et al. Evaluation of Stallion Semen Before and After Freezing. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 33, p. 271-277, 1998.

WALLACE, J. Pharm profile: meloxicam. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 15, p. 64-65, 2006.

WEBER, J. A. et al. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of Reproduction**. v. 45, p. 544-546, 1991.

WEISS, D. J. et al. Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation on experimentally induced laminitis in ponies. **American Journal of Veterinary Research**. v. 59, p. 814-817, 1998.

WEISS, D. J. et al. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. **American of Journal Veterinary Research**. v. 58, p. 1376-1380, 1997.

WHITE, G. W. et al. Efficacy of systemically administered antiarthritic drugs in an induced equine carpitis model. **AAEP Proceedings**, v. 42, p. 135-138, 1996.

WILCKE, J. R. et al. Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy foals less than twenty-four hours old. **American Journal of Veterinary Research**. v. 59, p. 290-292, 1998.

WOODS, J. et al. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E2 prior to insemination of mares in the uterine horn or body. **Theriogenology**. v. 53, p. 1827-1836, 2000.

WONG, P. Y. D. et al. Regulation of anion secretion by cyclooxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from rat. **Journal of Physiology**. v. 514, p. 809-820, 1999.