

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

PAULO SÉRGIO DE ALMEIDA AUGUSTO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DA METFORMINA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DORES NOCICEPTIVA, INFLAMATÓRIA E
NEUROPÁTICA E INFLAMAÇÃO**

Belo Horizonte - MG

2016

PAULO SÉRGIO DE ALMEIDA AUGUSTO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DA METFORMINA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DORES NOCICEPTIVA, INFLAMATÓRIA E
NEUROPÁTICA E INFLAMAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores:

Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho

Prof. Dr. Renes de Resende Machado

Belo Horizonte – MG

2016

A923a Augusto, Paulo Sérgio de Almeida.
Avaliação das atividades da metformina em modelos experimentais de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática e inflamação / Paulo Sérgio de Almeida Augusto. – 2016.

109 f. il.

Orientador: Márcio de Matos Coelho.
Co-Orientador: Renes de Resende Machado.

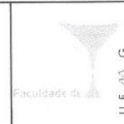
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Agentes anti-inflamatórios – Teses. 2. Dor – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Opioides – Teses. 5. Serotonina – Teses. I. Coelho, Márcio de Matos. II. Machado, Renes de Resende. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

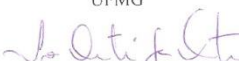
**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DA METFORMINA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DORES NOCICEPTIVA, INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA
E INFLAMAÇÃO**

PAULO SÉRGIO DE ALMEIDA AUGUSTO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Carlyne Margotto Bertollo
UFMG


Prof. Igor Dimitri Gama Duarte
UFMG


Prof. Renes de Resende Machado - Coorientador
UFMG


Prof. Márcio de Matos Coelho - Orientador
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico o grau de Mestre

Ao camundongo que primeiro partiu para que esse trabalho fosse realizado, dedico, como um pedido de desculpas, o grau de mestre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sopro da vida.

Ao meu pai, por ter me ensinado a ter coragem e a ser persistente e honesto.

À minha mãe, por sua infinita bondade, amor e compreensão.

Ao meu irmão, por toda a amizade, solidariedade e companheirismo.

Ao Professor Márcio, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por transmitir o espírito crítico em suas aulas na graduação e durante o mestrado, sempre incentivando 'duvidar' e analisar o que se publica na ciência.

Ao Professor Renes, por demonstrar que conhecimento e humildade podem caminhar juntos. Um exemplo de dedicação e didática, sempre disposto a ajudar e a ensinar.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Faculdade de Farmácia, que me concederam conhecimento e suporte para que esse trabalho fosse realizado.

À Dona Manoelina e à Dona Maria da Penha, as melhores avós que eu poderia ter. Obrigado pelas boas lembranças da infância e pelos exemplos de vida.

Ao meu avó Peixoto, um exemplo de força e caráter.

Aos meus tios e tias, especialmente à tia Ivani, tia Andreia e à Madrinha Lúcia, minhas outras mães.

Aos meus primos, especialmente ao André, Cesinha, Marcos Paulo e José Augusto, que dividiram comigo os ótimos momentos de encontro da melhor família de todas.

Ao meu amigo e irmão de vida, Felipe, pelas quase duas décadas de amizade e companheirismo.

À Evelyn, uma amiga insubstituível que o tempo já transformou em irmã.

À Priscila e à Tamiris, que formaram comigo o trio inseparável do primeiro ano.

À Anna Carolina e à Júlia, por dividirem comigo os altos e baixos da graduação.

Ao Wélder, o amigo quase virtual, mas sempre presente.

Aos irmãos que o CEFET me presenteou, Rafael, Bruno, Brunín, Luccas e Gabriel, que tornaram mais leve a etapa mais importante da minha vida.

À Marianne Sardenberg, amiga sempre alegre, radiante e disposta a ajudar.

À Mívia, que me acompanha desde a 6ª série.

Aos amigos de faculdade, Kennedy, Thaís, Morgana, Patrícia, Iwanna e Ana Luíza, que me acompanharam nesses longos cinco anos de graduação tornando-os menos difíceis e mais alegres.

Aos amigos do CEFET Leo, Larissa, Camila, Rayana e Diego, pela amizade, festas e encontros sempre inesquecíveis.

Aos amigos e colegas do laboratório, Marcela Bini, Tamires, Carla, Giovanna, Ivo, Adriana, Ana Mercy, Marcela Ísis e Felipe, que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído, seja ajudando nos experimentos, transmitindo conhecimentos e experiências ou mesmo oferecendo suporte emocional para os dias mais difíceis.

À Professora Sheila, pelo apoio e conversas sempre agradáveis e descontraídas.

À Nina Canuto, pelo profissionalismo exemplar.

Aos amigos do biotério, Adelaide e Batista, pela dedicação e profissionalismo no atendimento e fornecimento dos animais.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela competência no trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

E aos demais, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Se eu tiver me esquecido de algum amigo, perdoe a memória já falha deste jovem pesquisador, mas saiba que sou grato a você.

Dor Elegante

*Um homem com uma dor
É muito mais elegante
Caminha assim de lado
Com se chegando atrasado
Chegasse mais adiante*

*Carrega o peso da dor
Como se portasse medalhas
Uma coroa, um milhão de dólares
Ou coisa que os valha*

*Ópios, édens, analgésicos
Não me toquem nesse dor
Ela é tudo o que me sobra
Sofrer vai ser a minha última obra*

Paulo Leminski

RESUMO

A metformina é um fármaco hipoglicemiante indicado para o tratamento de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Embora alguns estudos tenham demonstrado que esse fármaco possui atividade anti-inflamatória, provavelmente relacionada à inibição da produção de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17 e NO, pouco se sabe sobre os efeitos induzidos pela metformina em modelos experimentais de dor. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da metformina em modelos experimentais de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática em camundongos, bem como os possíveis mecanismos que mediarão essa atividade, de forma a contribuir para a ampliação do conhecimento sobre o seu perfil farmacológico e proporcionar evidências que permitam avaliar a possibilidade de seu reposicionamento no tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas diversas. A administração de metformina (250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, -1 h) reduziu as respostas nociceptivas induzidas por calor no modelo de placa quente (50 °C) e por formaldeído (1%, 20 μ L, *s.c.*). Esse fármaco também reduziu a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por carragenina (600 μ g, 30 μ L, *i.pl.*), bem como a pleurisia induzida por esse estímulo inflamatório (200 μ g, intrapleural). Nos modelos de alodínia e edema de pata induzidos por carragenina, a metformina também apresentou eficácia quando administrada após a indução da inflamação. A metformina também apresentou atividade no modelo de dor neuropática induzida por constrição de nervo. O tratamento com esse fármaco (1000 mg/kg) durante três dias, a partir do 7º dia após o procedimento cirúrgico, reverteu a alodínia mecânica e não induziu tolerância. A metformina não alterou o tempo de permanência dos camundongos na haste girante, indicando que a inibição do comportamento nociceptivo é resultado de uma atividade antinociceptiva genuína. Embora estudos anteriores levem à sugestão de que a ativação de AMPK e a interação com receptores imidazolinícos, bem como a inibição da produção de mediadores inflamatórios, possam mediar a atividade antinociceptiva da metformina, no presente estudo foi demonstrado que outros mecanismos podem estar envolvidos. A atividade da metformina em modelo de dor nociceptiva induzida por calor foi atenuada pela administração prévia de naltrexona (5 ou 10 mg/kg, *i.p.*) ou ciproheptadina (5 ou 10 mg/kg, *p.o.*). Em contrapartida, a atividade antinociceptiva desse fármaco em modelo de dor inflamatória foi totalmente revertida pela administração prévia de glibenclamida (20 ou 40 mg/kg, *p.o.*). Concluindo, os resultados demonstram a atividade da metformina em modelos de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática, bem como em modelos de edema inflamatório e pleurisia. Além disso, os resultados indicam que a atividade antinociceptiva desse fármaco pode ser mediada pela ativação de vias opioidérgicas e serotoninérgicas, bem como de canais para potássio ATP-dependentes. A demonstração da atividade da metformina em vários modelos de dor e inflamação pode estimular a realização de estudos visando o reposicionamento desse fármaco no tratamento de pacientes com condições dolorosas e inflamatórias.

Palavras chave: metformina, dor, nocicepção, inflamação, opioides, serotonina, canais para potássio ATP-dependentes, AMPK.

ABSTRACT

Metformin is an oral hypoglycemic drug widely used to treat patients with type 2 diabetes. Although some studies have demonstrated that metformin exhibits anti-inflammatory activity, probably associated with inhibition of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17 and NO production, little is known about its effects in experimental models of pain. Thus, the present study aimed to evaluate the activity of metformin in experimental models of nociceptive, inflammatory and neuropathic pain in mice, as well as the mechanisms mediating this activity. The study may contribute to a greater knowledge of metformin pharmacological profile and provide support to its repositioning in the treatment of patients with painful and inflammatory diseases. Metformin (250, 500 or 1000 mg/kg, *p.o.*, -1 h) inhibited the nociceptive response induced by heat in hot plate (50 °C) and formaldehyde (1%, 20 μ L, *s.c.*). Metformin also inhibited the mechanical allodynia and paw edema induced by carrageenan (600 μ g, 30 μ L, *i.p.*), as well as the pleurisy induced by this stimuli (200 μ g, intrapleural). In the models of mechanical allodynia and paw edema induced by carrageenan, metformin also exhibited activity when administered after induction of the inflammation. Metformin also exhibited activity in the model of neuropathic pain induced by chronic constriction injury. Treatment with metformin (1000 mg/kg) during three days, from the 7th day after the constriction of the sciatic nerve, reverted the mechanical allodynia without inducing tolerance. Metformin did not change the time mice spent on the rota-rod, indicating that the inhibition of the nociceptive behavior results from an intrinsic antinociceptive activity. Although previous studies have suggested that activation of AMPK and interaction with imidazolinic receptors, as well as reduced production of inflammatory mediators, may mediate the antinociceptive activity of metformin, the present study indicates that other mechanisms may be involved. The activity of metformin in the model of nociceptive pain induced by heat was attenuated by previous administration of naltrexone (5 or 10 mg/kg, *i.p.*) or cyproheptadine (5 or 10 mg/kg, *p.o.*). In addition, in the model of inflammatory pain, the activity of metformin was abolished by previous administration of glibenclamide (20 ou 40 mg/kg, *p.o.*). In conclusion, the results demonstrate the activity of metformin in models of nociceptive, inflammatory and neuropathic pain, as well as in models of inflammatory edema and pleurisy. In addition, the results indicate that the activity of metformin may be mediated by activation of opioidergic and serotonergic pathways, as well as ATP-sensitive potassium channels. The demonstration of the activity of metformin in various pain and inflammation models may stimulate the conduction of studies aiming its repositioning in the treatment of patients with painful and inflammatory disorders.

Key-words: metformin, pain, nociception, inflammation, opioids, serotonin, ATP-sensitive potassium channels, AMPK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécie vegetal <i>Galega officinalis</i>.....	30
Figura 2 – Estrutura química da metformina	31
Figura 3 – Efeitos metabólicos da ativação da ativação da AMPK.....	33
Figura 4 – Camundongo Swiss	38
Figura 5 - Aparato utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor.....	42
Figura 6 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre a resposta nociceptiva induzida por calor em camundongos	42
Figura 7 – Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica	43
Figura 8 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (primeiro protocolo).....	44
Figura 9 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (segundo protocolo)	44
Figura 10 - Aparato utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	45
Figura 11 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos	46
Figura 12 – Haste girante utilizada para avaliar a atividade motora de camundongos	48
Figura 13 – Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pela metformina ou pelo fenobarbital sobre a coordenação motora.....	48
Figura 14 - Aparato utilizado para a avaliação do edema de pata.....	49
Figura 15 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre o edema de pata induzido por carragenina (primeiro protocolo).....	50
Figura 16 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre o edema de pata induzido por carragenina (segundo protocolo)	50
Figura 17 - Escala temporal de pré-tratamento dos animais com metformina <i>p.o.</i> e administração de carragenina por via intrapleurar no modelo de pleurisia	51
Figura 18 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina, após tratamento prévio com naltrexona, sobre a nocicepção induzida por calor em camundongos.....	52
Figura 19 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina, após tratamento prévio com glibenclamida ou ciproheptadina, sobre a nocicepção induzida por calor em camundongos	52

Figura 20 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina, após tratamento prévio com naltrexona, sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	53
Figura 21 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina, após tratamento prévio com glibenclamida ou ciproheptadina, sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	53
Figura 22 - Efeito induzido pela metformina sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente.....	54
Figura 23 - Efeito induzido pela metformina sobre o comportamento de lambida de pata induzido por formaldeído em camundongos	55
Figura 24 - Efeito induzido pela metformina ou pela indometacina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (primeiro protocolo)	57
Figura 25 - Efeito induzido pela metformina ou pela indometacina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (segundo protocolo).....	58
Figura 26 – Alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático.....	60
Figura 27 – Efeito induzido pela metformina (7º dia após cirurgia) sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático	61
Figura 28 – Efeito induzido pela metformina (8º dia após cirurgia) sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático	62
Figura 29 – Efeito induzido pela metformina (9º dia após cirurgia) sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático	63
Figura 30 – Efeito induzido pela metformina ou pelo fenobarbital sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante	64
Figura 31 - Efeito induzido pela metformina ou pela dexametasona sobre o edema de pata induzido por carragenina (primeiro protocolo)	66
Figura 32 - Efeito induzido pela metformina ou pela dexametasona sobre o edema de pata induzido por carragenina (segundo protocolo).....	67
Figura 33 – Efeito induzido pela metformina sobre a migração de leucócitos totais ou neutrófilos induzida por carragenina.....	68
Figura 34 – Efeito induzido pela naltrexona sobre a atividade antinociceptiva da metformina em modelo de placa quente	69
Figura 35 – Efeito induzido pela ciproheptadina sobre a atividade antinociceptiva da metformina em modelo de placa quente	70
Figura 36 – Efeito induzido pela glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva da metformina em modelo de placa quente	71
Figura 37 – Efeito induzido pela naltrexona sobre a atividade antialodínica da metformina.....	73

Figura 38 – Efeito induzido pela glibenclamida sobre a atividade antialodínica da metformina.....	74
Figura 39 – Efeito induzido pela ciproheptadina sobre a atividade antialodínica da metformina.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
%	Porcentagem
Δ	Varição
5-HT	Serotonina
ADP	Adenosina difosfato
AIE	Anti-inflamatório esteroide
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofostato cíclica
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BSA	Albumina de soro bovino
CA	Califórnia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjuvante completo de Freund
Cg	Carragenina
Cipro	Ciproheptadina
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
COX	Ciclooxigenase
D.C	Depois de Cristo
Dexa	Dexametasona
<i>et al.</i>	e outros
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Força gravitacional
Glib	Glibenclamida
h	Hora

I	Receptor imidazolínico
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Indo	Indometacina
kg	Quilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Ltda	Limitada
Metf	Metformina
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
N	Newton
n	Número de animais experimentais
Nalt	Naltrexona
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento de nervos
nº	Número
NO	Óxido nítrico
OCT	Transportador de cátions orgânicos
P	Probabilidade de significância
p.	Página
p.o.	<i>per os</i>
p/v	Concentração em peso por volume
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
PP	Ponteira de polietileno
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
rpm	Rotações por minuto

s	Segundo
s.c.	Subcutâneo
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
TF	Transdutor de força
TNF	Fator de necrose tumoral
trkA	Tropomiosina quinase A
TRPV	Receptor vaniloide de potencial transitório
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
v	Volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Dor e inflamação	17
1.1.1 <u>Dor nociceptiva</u>	17
1.1.2 <u>Dor inflamatória</u>	18
1.1.3 <u>Dor neuropática</u>	21
1.1.4 <u>Dor funcional</u>	23
1.2 Farmacoterapia da dor e da inflamação	23
1.2.1 <u>Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)</u>	24
1.2.2 <u>Anti-inflamatórios esteroides (AIEs)</u>	25
1.2.3 <u>Analgésicos opioides</u>	26
1.3 Reposicionamento de fármacos	27
1.4 Metformina	30
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVO	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Animais experimentais	38
4.2 Drogas, fármacos e reagentes diversos	38
4.3 Preparo das soluções e suspensões, doses e vias de administração	39
4.4 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor	41
4.5 Avaliação da alodínia mecânica induzida por carragenina	42
4.6 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído	44
4.7 Avaliação da alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático	46
4.8 Avaliação da atividade motora	47
4.9 Avaliação do edema de pata induzido por carragenina	48
4.10 Avaliação da pleurisia induzida por carragenina	50
4.11 Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva da metformina	51
4.12 Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade antialodínica da metformina	52
4.13 Análise estatística	53

5 RESULTADOS	54
5.1 Efeito induzido pela metformina sobre a resposta nociceptiva induzida por calor	54
5.2 Efeito induzido pela metformina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído	55
5.3 Efeito induzido pela metformina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina	55
5.4 Efeito induzido pela metformina sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático	59
5.5 Efeito induzido pela metformina sobre a atividade motora	64
5.6 Efeito induzido pela metformina sobre o edema de pata induzido por carragenina	64
5.7 Efeito induzido pela metformina sobre a pleurisia induzida por carragenina	65
5.8 Efeitos induzidos pela naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva da metformina	69
5.9 Efeitos induzidos pela naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade antialodínica da metformina	71
6 DISCUSSÃO	76
6.1 Atividade da metformina em modelos de dor	76
6.2 Atividade da metformina em modelos de inflamação	83
6.3 Avaliação do papel da ativação de vias opioidérgicas, serotoninérgicas e de canais para potássio ATP-dependentes na atividade antinociceptiva da metformina	85
6.4 Limitações	87
6.5 Perspectivas	88
7 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e inflamação

Desde tempos remotos, a dor é uma das experiências mais intrigantes vivenciadas pelo ser humano, tendo diversas interpretações, muitas delas impregnadas de certo misticismo. A dor é uma experiência sensorial multidimensional, intrinsecamente desagradável, resultante da integração de vários mecanismos neurais e associada a diversos processos patológicos (RAINVILLE, 2002). O conhecimento desses mecanismos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de muitos tratamentos ocorreram de forma mais ampla após anos de evolução dos métodos científicos (OJUGAS, 1999; MARQUEZ, 2011). Claramente, a dor é o sintoma que mais leva pacientes a procurarem ajuda médica e o que causa maior sofrimento ao ser humano (LOESER & MELZACK, 1999).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais, emocionais e cognitivos e que está associada a uma lesão real ou potencial (IASP 1). Portanto, a manifestação nociceptiva não envolve apenas a transdução de sinais pelo sistema nervoso, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (CHAPMAN *et al.*, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004). Nesse contexto, a dor aguda é uma manifestação clínica extremamente importante para o diagnóstico de várias doenças e para induzir um comportamento de precaução, evitando maiores danos ao organismo (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004), o que caracteriza as suas funções evolutiva e adaptativa vitais (CHAPMAN *et al.*, 1999). De acordo com Woolf (2004), a dor pode ser categorizada em quatro tipos principais conforme os mecanismos neuroquímicos envolvidos, descritos a seguir.

1.1.1 Dor nociceptiva

A dor nociceptiva é resultado da estimulação de nociceptores por fatores térmicos, químicos ou mecânicos, com conseqüente ativação das vias centrais

da dor (MILLAN, 1999). Segundo a IASP, a nocicepção é o processo neural de codificação da dor e o nociceptor é um receptor sensorial de alto limiar do sistema nervoso periférico (SNP) somatossensorial capaz de transduzir e codificar estímulos nocivos (IASP 1). Nesse contexto, os estímulos ativam diretamente os neurônios sensoriais de diâmetro médio e levemente mielinizados, denominados nociceptores A δ , e os neurônios sensoriais de menor diâmetro e não mielinizados, denominados nociceptores C, o que pode resultar em dor (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A dor nociceptiva é uma resposta protetora que visa evitar ou reduzir uma lesão tecidual, acelerar a cicatrização do tecido e promover a recuperação do paciente, sendo um importante mecanismo de defesa adaptativo (SCHOLZ & WOOLF, 2002). Em vista de sua importante função, visa-se o alívio da dor nociceptiva apenas em pacientes que a relatam de forma intensa durante situações nas quais essa função não é evidente, como procedimentos cirúrgicos ou após traumas.

Os distúrbios envolvendo a percepção de dor, como a insensibilidade nociceptiva congênita, reduzem drasticamente a expectativa de vida do paciente, demonstrando a importância vital dessa experiência. Essas doenças estão relacionadas a mutações gênicas que resultam na ausência de canais iônicos essenciais para o processamento nociceptivo e/ou ao aumento excessivo da liberação de opioides endógenos (NAGASAKO *et al.*, 2003; BASBAUM *et al.*, 2002; WOOLF, 2004).

1.1.2 Dor inflamatória

A dor inflamatória é a categoria mais comum e a que leva o maior número de pacientes a buscar alternativas para o seu alívio (SCHOLZ & WOOLF, 2002).

A inflamação ou flogose (derivado de "*flogístico*" que, em grego, significa "queimar") é uma resposta do organismo a uma agressão de natureza estéril ou infecciosa que tem o objetivo de restaurar a homeostasia perdida (COLLINS, 1999). Aparentemente, o primeiro a definir os sinais e sintomas clínicos cardinais da inflamação - *rubor, tumor, calor e dolor* (eritema, edema,

calor e dor) - foi o médico romano no século 1 D.C., Cornelius Celsus. Posteriormente, em 1858, Rudolf Virchow adicionou a quinta característica da inflamação, a *functio laesa*, que é a perda ou redução da função dos órgãos envolvidos (MEDZHITOV, 2010). Desde então, existe um amplo interesse em entender os mecanismos envolvidos neste complexo processo fisiopatológico.

A inflamação pode ocorrer de forma aguda ou crônica. A inflamação aguda é de duração relativamente curta, pode permanecer por minutos, horas ou poucos dias e suas principais características são exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas – ocasionando o edema – e migração de leucócitos. Na fase inicial da inflamação, os neutrófilos são os leucócitos prevalentes. A inflamação crônica é de longa duração e está intimamente associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (COLLINS, 1999).

A reação inflamatória é caracterizada por uma série de eventos complexos no tecido afetado, incluindo vasodilatação arteriolar, seguida de aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, exsudação plasmática e migração leucocitária para o espaço extravascular. Essas alterações ocorrem principalmente na microcirculação, decorrentes da ação de moléculas biologicamente ativas liberadas no local da lesão, denominados mediadores inflamatórios (WEISSMANN, 1992; COTRAN *et al.*, 1999; COLLINS, 1999; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Os mediadores inflamatórios podem ser de origem celular, como a histamina, os eicosanoides, as citocinas, o óxido nítrico (NO), o fator ativador de plaquetas (PAF) e outras proteínas leucocitárias ou de origem plasmática, como as cininas e os componentes do sistema de complemento (ROCHA e SILVA & GARCIA-LEME, 1972; FERREIRA *et al.*, 1973). As concentrações de muitos desses mediadores são rapidamente elevadas durante o processo inflamatório (COLLINS, 1999; MEDZHITOV, 2010).

A liberação dos mediadores inflamatórios por células residentes (macrófagos, células dendríticas e células epiteliais) no tecido lesionado ativa os leucócitos circulantes e induz alterações rápidas e intensas nas propriedades de adesão

às células endoteliais pelo aumento da expressão de receptores glicoproteicos (moléculas de adesão) em suas membranas bem como na membrana das células endoteliais. Essas alterações aumentam a adesão entre os leucócitos e o endotélio, promovendo o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. Os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório mediante a liberação de citocinas, destacando-se, inicialmente, a liberação de interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (KIM & DEUTSCHMAN, 2000; NOURSHARGH & MARELLI-BERG, 2005).

Os sinais e sintomas cardinais da inflamação podem ser explicados pelos eventos provocados pelas células envolvidas no processo e seus mediadores. O edema local decorre do aumento da permeabilidade vascular e do extravasamento de líquidos e plasma para o meio tissular, enquanto o calor e o eritema decorrem do aumento da perfusão sanguínea local. A dor inflamatória é resultado de mecanismos complexos que incluem compressão das fibras nervosas locais devido ao edema, lesão de fibras nervosas e ação de mediadores inflamatórios sobre as terminações nervosas. A perda de função é decorrente dos outros sinais cardinais, especialmente do edema e da dor, que dificultam as atividades locais. Além disso, a cronificação do processo inflamatório também pode ocasionar perda de função devido à destruição tecidual e substituição do parênquima por tecido conjuntivo, processo denominado fibrose (COLLINS, 1999; MEDZHITOV, 2010).

A dor é um sintoma comum e importante da inflamação. Assim como a dor nociceptiva, a dor inflamatória aguda tem função adaptativa e induz comportamentos de esquiva que favorecem a reparação (WOOLF, 2004). A liberação de mediadores inflamatórios pode sensibilizar ou estimular nociceptores gerando alodínia ou hiperalgesia (McMAHON *et al.*, 2005). Segundo a IASP, a alodínia é definida como a dor causada por um estímulo que, normalmente, não provoca dor, enquanto a hiperalgesia é caracterizada pela dor de maior intensidade causada por um estímulo originalmente doloroso (IASP 1).

Diversos mediadores podem levar ao surgimento da dor inflamatória, tais como o TNF- α , a IL-1 β , as prostaglandinas (PGs), o fator de crescimento de nervos (NGF) e a bradicinina (COLLINS, 1999; SCHOLZ & WOOLF, 2002). O NGF participa do processamento da resposta nociceptiva por diversos mecanismos, tais como: interação com receptores trkA de nociceptores, o que leva à sua ativação; regulação da expressão gênica em nociceptores, induzindo a liberação de neuropeptídeos como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que estão envolvidos na transmissão central e na modulação da resposta nociceptiva e regulação da expressão de receptores do tipo TRPV1 e de canais para sódio. O TNF- α e a IL-1 β são citocinas que induzem facilitação da resposta nociceptiva por meio do NGF (McMAHON *et al.*, 2005). As PGs e a bradicinina interagem com receptores acoplados à proteína G, ativando proteínas cinases que fosforilam receptores e canais iônicos, o que resulta na redução do limiar nociceptivo (SCHOLZ & WOOLF, 2002).

A resolução da resposta inflamatória decorre da inativação dos mediadores e do retorno à homeostasia, ou seja, o término do edema, da infiltração de leucócitos e da dor resultante da estimulação dos nociceptores. Em alguns casos, porém, a liberação de substâncias tóxicas para o meio extracelular, tais como enzimas lisossomais, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, PGs e leucotrienos, pode promover a cronificação do processo inflamatório e surgimento de doenças como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (COLLINS, 1999; MEDZHITOV, 2010). A resolução da inflamação também é resultado da ação de um complexo sistema de moléculas com atividade anti-inflamatória, que evitam a cronificação do processo e a extensão de danos teciduais que iriam além da reparação do local lesionado (SERHAN & SAVIL, 2005; ALESSANDRI *et al.*, 2013).

1.1.3 Dor neuropática

A dor neuropática é definida pela IASP como uma dor causada ou iniciada por uma lesão primária ou por disfunção do sistema nervoso central (SNC) e/ou SNP (IASP 1). Diferentemente da dor nociceptiva e da dor inflamatória, em

muitas situações, a dor neuropática não possui função adaptativa (WOOLF, 2004; JENSEN *et al.*, 2011).

A lesão ou disfunção do SNC ou SNP que contribui para a ocorrência da dor neuropática pode ser resultado de compressão, secção e inflamação de nervos, isquemia, injúria metabólica, deficiência de vitamina B, ação de neurotoxinas, terapias com fármacos antineoplásicos, infecções virais, diabetes mellitus, doença de Parkinson e diversos outros fatores (GALLUZZI, 2007; HEHN *et al.*, 2012).

A dor neuropática se estabelece por mecanismos diversos levando a diferentes manifestações clínicas. O paciente pode relatar sintomas denominados negativos (dormência, hipoalgesia e hipoestesia), resultantes de danos diretos aos neurônios sensoriais, ou sintomas positivos (alodínia e hiperalgesia), resultantes da diminuição do limiar nociceptivo. É comum que o paciente relate dor espontânea manifestando-se como choques elétricos ou ardência na pele (BARON *et al.*, 2010; HEHN *et al.*, 2012).

Os mecanismos frequentemente associados ao aparecimento de dor neuropática são atividade ectópica de neurônios, sensibilizações periférica e central e neuroinflamação. A atividade ectópica dos neurônios é a principal causa da dor espontânea em pacientes com dor neuropática. Essa atividade é caracterizada por mudanças drásticas na expressão, na distribuição e na fosforilação de diversos canais iônicos, levando à geração de potenciais de ação na ausência de qualquer estímulo e, conseqüentemente, ao relato de dor. O mecanismo de sensibilização central envolve um aumento na excitabilidade de neurônios secundários resultando em uma hiperexcitabilidade da medula espinhal, que passa a perceber informações transmitidas por neurônios sensoriais de baixo limiar (tipo A β) como estímulos dolorosos. A sensibilização central é um mecanismo que pode se tornar autônomo, resultando em amplificação da dor, com diminuição de seu limiar, expansão de sua extensão espacial e mudanças nas suas características sensoriais. A neuroinflamação é um mecanismo decorrente da liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos infiltrados nos tecidos próximos a nervos periféricos lesionados. Os mediadores ativam células do sistema imune e microgliais, induzindo a

liberação de citocinas inflamatórias que promovem a dor e contribuem para a sua cronificação (SCHOLZ & WOOLF, 2002; WOOLF, 2004; BARON *et al.*, 2010; VALLEJO *et al.*, 2010; HEHN *et al.*, 2012). Além da dor crônica que causa grande sofrimento, muitos pacientes com dor neuropática também desenvolvem comorbidades como insônia, transtornos depressivos e de ansiedade, o que reduz ainda mais a qualidade de vida (SELPH *et al.*, 2011; SMITH & TORRANCE, 2012; COHEN & MAO, 2014).

1.1.4 Dor funcional

A dor funcional é uma categoria de dor menos conhecida, de caráter crônico e idiopático, associada a um funcionamento e/ou uma reatividade anormal do sistema nervoso cujas causas são desconhecidas. Algumas condições clínicas como fibromialgia, síndrome do intestino irritável e cefaleia tensional podem ser alocadas nessa categoria de dor. De fato, a dor funcional é um conceito em evolução, o qual necessita maiores estudos para sua melhor compreensão. Sabe-se que esse tipo de dor também não apresenta função adaptativa, assim como a dor neuropática, porém pacientes com dor funcional não apresentam déficit neurológico ou alguma anormalidade neuronal periférica, podendo envolver disfunções nos neurotransmissores ou nos canais iônicos (WOOLF, 2004).

1.2 Farmacoterapia da dor e da inflamação

A dor é um sintoma que causa sofrimento a pacientes acometidos por diversas doenças. O alívio da dor deve levar em consideração as suas causas e os mecanismos neuroquímicos envolvidos. Tal alívio pode ser obtido por meio de medidas farmacológicas e não farmacológicas e a intervenção deve ser o mais breve possível, visando eliminar a causa da dor e reintegrar o paciente às suas funções normais (CANDELETTI *et al.*, 1985; RAMAMURTHY *et al.*, 1993; CATALANO *et al.*, 2004). Embora diversas terapias possam ser usadas visando promover o alívio da dor, a farmacoterapia é a mais comum. Várias classes de fármacos podem ser usadas e apresentam diferentes perfis de eficácia e segurança.

1.2.1 Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)

Os AINEs, como o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno, são fármacos amplamente usados na clínica médica e apresentam atividades analgésica, antipirética e anti-edema, sendo particularmente úteis para o alívio de dores inflamatórias. Os AINEs são os fármacos de escolha para o tratamento de pacientes relatando dores leves a moderadas, tais como cefaleias e enxaquecas, dores pós-operatória, dental e menstrual (RANG *et al.*, 2007; FURST & ULRICH, 2007; GROSSER *et al.*, 2012;).

O principal mecanismo de ação proposto para os AINEs foi descrito algumas décadas depois da inserção do ácido acetilsalicílico na medicina. Vane (1971) demonstrou que esse fármaco inibe a ciclooxigenase (COX), uma enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em PGG₂ e PGH₂. Essas, por sua vez, servirão de substrato para outras enzimas para a produção de PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF₂α e tromboxano A₂, substâncias diretamente responsáveis pelo aparecimento de alguns dos sinais e sintomas da resposta inflamatória. Por um longo período, acreditou-se que havia apenas uma isoforma de COX. Entretanto, a segunda isoforma da COX, denominada COX-2, foi descoberta no final dos anos 1980 e início dos anos 1990. A COX-1, denominação dada à primeira enzima descoberta, participa de vários processos fisiológicos, sendo considerada constitutiva, enquanto que a COX-2 é especialmente importante no processo inflamatório, no qual a sua atividade está aumentada (FU *et al.*, 1990; XIE *et al.*, 1990; KUJUBU *et al.*, 1991). Assim, a ação anti-inflamatória dos AINEs se deve principalmente à inibição da COX-2 e as reações adversas estão relacionadas principalmente à inibição da COX-1 (CROFFORD *et al.*, 2000). As reações adversas induzidas pelos AINEs incluem irritação gástrica, podendo levar a ulcerações da mucosa, redução do fluxo sanguíneo renal e prolongamento do sangramento por inibição da agregação plaquetária (RANG *et al.*, 2007).

Os coxibes, fármacos que inibem preferencialmente a isoforma COX-2, foram desenvolvidos com o objetivo de reduzir as reações adversas induzidas pela inibição da COX-1. Porém, a inibição da produção de PGI₂ – um eicosanoide que inibe a agregação plaquetária e cuja produção é induzida principalmente

pela COX-2 - leva ao risco de eventos tromboembólicos, o que resultou na retirada de vários fármacos dessa classe do mercado (MUKHERJEE & TOPOL, 2003). O uso dos coxibes é restrito a pacientes para os quais a terapia com AINEs está associada a risco elevado de reações adversas gastrointestinais e só deve ocorrer após uma avaliação do risco cardiovascular (RANG *et al.*, 2007; GROSSER *et al.*, 2012).

1.2.2 Anti-inflamatórios esteroides (AIEs)

Os AIEs, como a dexametasona e a prednisolona, são fármacos anti-inflamatórios e imunossuppressores utilizados principalmente no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias crônicas, tais como asma, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (BARNES & ADCOCK, 1993).

O principal mecanismo de ação dos AIEs envolve diretamente o controle da transcrição gênica, seja estímulo ou inibição. Após se ligar aos receptores no citoplasma, o complexo é transportado para o núcleo onde, ao interagir com o DNA, pode ativar a transcrição de genes para proteínas anti-inflamatórias ou inibir a transcrição de genes para enzimas ou mediadores inflamatórios. Algumas ações não genômicas e de curta duração dos AIEs também foram descritas (van der VELDEN, 1998). As ações dos AIEs que influenciam as respostas inflamatória e imune incluem: produção reduzida de eicosanoides, devido à redução da expressão do gene para a COX-2; produção reduzida de citocinas, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α e fatores de adesão celular; produção reduzida de NO e aumento da síntese de fatores anti-inflamatórios como a IL-10, receptor solúvel de IL-1 e anexina-1 (STAHN & BUTTGEREIT, 2008).

Embora as atividades anti-inflamatória e imunossupressora dos AIEs sejam bem estabelecidas, o uso desses fármacos é limitado pelas reações adversas que podem induzir quando ocorre a prescrição de doses elevadas e de forma contínua. As reações adversas incluem supressão da resposta imune, dificuldade da cicatrização de lesões, insuficiência adrenal, desequilíbrio hidroeletrólítico, elevação da pressão arterial e hiperglicemia (RANG *et al.*, 2007).

Em adição, a elevação dos níveis de cortisol (hipercortisolismo) por períodos prolongados, provocada pelo uso crônico de AIEs, pode ocasionar o surgimento da síndrome de Cushing iatrogênica, caracterizada principalmente por obesidade centrípeta, adelgaçamento da pele e fraqueza muscular (NIEMAN, 2015).

1.2.3 Analgésicos opioides

Os analgésicos opioides, como a morfina e a codeína, são fármacos de escolha para o tratamento de pacientes com dores moderadas a intensas, que geralmente não conseguem um alívio adequado por meio do uso de AINEs. Os analgésicos opioides são particularmente úteis para a alívio da dor intensa de pacientes com determinados tipos de tumores ou sob cuidados paliativos (LEMONICA, 2008). Esses fármacos interagem com três tipos de receptores (μ , κ e δ), que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G. A interação dos analgésicos opioides com os receptores pode resultar em várias alterações bioquímicas importantes que contribuem para a analgesia induzida por esses fármacos. Entre as alterações mais importantes, podem ser citadas a inibição da adenilato ciclase e consequente redução da concentração de AMPc, a abertura de canais para potássio e a inibição de canais para cálcio, levando à hiperpolarização com consequente redução da neurotransmissão. Os analgésicos opioides não apresentam atividade anti-inflamatória ou antipirética, como os AINEs (SATO & MINAMI, 1995; LEMONICA, 2008).

Embora apresentem elevada eficácia, o uso dos analgésicos opioides é limitado pelas reações adversas graves que podem induzir, tais como náuseas, vômitos, constipação, sedação, depressão respiratória e risco de morte quando usados em altas doses. Em adição, os opioides podem causar dependência e tolerância, o que leva à necessidade de doses cada vez maiores para induzir o alívio da dor (LEMONICA, 2008; BICCA *et al.*, 2012; YAKSH & WALLACE, 2012). Desse modo, o uso desses fármacos deve ser restrito aos casos nos quais a dor não pode ser aliviada com outros fármacos mais seguros (BICCA *et al.*, 2012).

Conforme as características mencionadas para os grupos de fármacos citados, constata-se que a farmacoterapia da dor e da inflamação é limitada, pois alguns fármacos apresentam eficácia limitada e outros, embora apresentem eficácia elevada, podem induzir reações adversas graves, principalmente em pacientes com dores crônicas. Assim, a busca de fármacos analgésicos mais eficazes e seguros, principalmente para o tratamento de pacientes com dores crônicas, é justificada.

1.3 Reposicionamento de fármacos

As descobertas sobre as bases moleculares das doenças ofereceram oportunidades sem precedentes para otimizar o desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, esse processo ainda é um grande desafio para as indústrias farmacêuticas, dado os altos investimentos necessários para as pesquisas e o tempo demandado. O desenvolvimento de um novo fármaco leva em torno de 15 anos, em média, desde a síntese da molécula até a sua aprovação pelas agências regulatórias, passando pelas fases de investigações pré-clínica *in vitro* e *in vivo*, clínica e desenvolvimento de uma formulação viável, além da fase final de farmacovigilância (ASHBURN & THOR, 2004; CHONG & SULLIVAN, 2007). As indústrias farmacêuticas não conseguem manter o ritmo de desenvolvimento e sintetizar fármacos que sejam realmente eficazes e efetivos, com um perfil de segurança adequado e que supram os custos de seu desenvolvimento (DIMASI *et al.*, 2003; LANDERS, 2012).

A taxa de insucesso da pesquisa que visa o desenvolvimento de novos fármacos é extremamente elevada, sendo comum a aprovação de fármacos da mesma classe terapêutica com eficácias semelhantes àsquelas de fármacos já conhecidos, mas promovidos como ‘melhores alternativas’, uma alegação que não é comprovada na prática clínica (CHONG & SULLIVAN, 2007). Existem vários fármacos para o tratamento de pacientes com doenças crônicas como transtornos depressivos e ansiosos, hipertensão e doenças cardiovasculares, enquanto há uma grande demanda por fármacos para o tratamento de pacientes com algumas doenças, especialmente infecciosas, que permanecem negligenciadas (SANTOS *et al.*, 2012).

Embora tenha havido avanços nas pesquisas, principalmente um conhecimento amplo das alterações moleculares subjacentes a várias doenças bem como uma otimização dos métodos de triagem de um elevado número de moléculas, o número de fármacos aprovados para uso clínico que são desenvolvidos a partir da triagem molecular ainda continua sendo inferior àquele de fármacos que foram identificados a partir de investigação fenotípica (ASHBURN & THOR, 2004; CHONG & SULLIVAN, 2007).

O reposicionamento de fármacos (do inglês, *drug repurposing*) é uma estratégia de inovação bem sucedida e explorada inclusive por grandes indústrias farmacêuticas, na tentativa de reduzir custos e obter novas aplicações para fármacos já existentes (ASHBURN & THOR, 2004). O reposicionamento é uma alternativa importante, especialmente na busca de terapias para doenças negligenciadas (ou órfãs), como a leishmaniose, a doença de Chagas e a malária (SARDANA *et al.*, 2011).

Entende-se como reposicionamento de um fármaco o uso de um fármaco, cujos perfis farmacocinético e de segurança já são conhecidos, no tratamento de pacientes com uma doença diferente daquela para a qual o fármaco foi originalmente aprovado. Essa investigação pode resultar na identificação de nova abordagem farmacoterapêutica em menor tempo e com redução de custos quando comparada ao planejamento e síntese de novos fármacos. Dessa forma, pesquisas visando o reposicionamento de fármacos têm sido cada vez mais estimuladas e têm ocorrido tanto nas indústrias farmacêuticas quanto na academia (CHONG & SULLIVAN, 2007; SWAMIDASS, 2011).

Embora não existam critérios definidos para a identificação de fármacos possivelmente 'reposicionáveis', determinadas características tornam um fármaco mais ou menos propício para ter uma nova aplicação. Em geral, fármacos que não agem em um alvo específico ou que apresentam pouca seletividade por este são mais propensos a apresentarem atividades distintas daquela que justificou a indicação terapêutica original. Em outra abordagem, pode-se investigar o efeito terapêutico pela ação no mesmo alvo molecular, uma vez que a mesma via bioquímica pode estar envolvida em processos distintos.

Porém, não é raro constatar que uma nova aplicação seja descoberta totalmente por acaso (SLEIGH & BARTON, 2010).

Na terapêutica atual, existem vários exemplos de fármacos originalmente desenvolvidos para uma terapia e que foram posteriormente reposicionados. A talidomida, originalmente utilizada para tratamento de gestantes com êmese, foi reposicionada para tratar pacientes com mieloma múltiplo ou hanseníase (OPROMOLLA, 2000; SLEIGH & BARTON, 2010; SAWAMIDASS, 2011). A cloroquina e a hidrocloroquina, dois fármacos antimaláricos, apresentam aplicação no tratamento de pacientes com doenças reumáticas, lúpus eritematoso sistêmico, doenças dermatológicas e diferentes tipos de câncer (ALBARI, 2015). O ácido acetilsalicílico, um AINE, é usado na prevenção de eventos tromboembólicos devido à capacidade de inibir a agregação plaquetária (ARONSON, 2007). A miltefosina, desenvolvida para o tratamento de câncer de pulmão, foi aprovada para o tratamento da leishmaniose visceral, uma doença negligenciada (CHONG & SULLIVAN, 2007).

As limitações da farmacoterapia analgésica atualmente disponível têm estimulado pesquisas visando o reposicionamento de fármacos de diversas classes terapêuticas como analgésicos (BASTOS & COELHO, 2013). Antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina e a nortriptilina, e anticonvulsivantes, como a gabapentina e a pregabalina, são atualmente recomendados para o tratamento de pacientes com dor neuropática (DWORKIN *et al.*, 2007; MOORE *et al.*, 2012; DERRYS *et al.*, 2015). A carbamazepina, um fármaco anticonvulsivante, é utilizada no tratamento de pacientes com neuralgia do trigêmeo. O propranolol e o topiramato, originalmente aprovados como antiarrítmico e anticonvulsivante, respectivamente, foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de pacientes com enxaqueca bem como para a sua profilaxia. A duloxetina e o milnaciprano, fármacos antidepressivos, são utilizados no tratamento de pacientes com fibromialgia (BASTOS & COELHO, 2013). As vitaminas do complexo B, especialmente a nicotinamida, também apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória bastante satisfatórias em modelos experimentais (GODIN *et al.*, 2011), assim como a leflunomida, um fármaco imunossupressor (BRITO, 2014), e o nicorandil,

um fármaco antianginoso (DUTRA *et al.*, 2013), o que gera a expectativa de que possam ser reposicionados para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas.

1.4 Metformina

A espécie vegetal *Galega officinalis* (**Figura 1**) era utilizada na Idade Média em algumas regiões da Europa para o tratamento de pacientes com poliúria, que posteriormente seria relacionada ao diabetes mellitus. A guanidina, responsável pela atividade hipoglicemiante da *G. officinalis*, induz toxicidade grave que impossibilita o seu uso como fármaco. Assim sendo, novos compostos foram sintetizados a partir dessa substância e as biguanidas provaram ser úteis e mais seguras para o tratamento dos pacientes diabéticos (WITTERS, 2001; BAILEY & DAY, 2004).

A fenformina e a buformina foram lançadas como antidiabéticos na década de 1960, porém foram retiradas do mercado anos depois devido à alta incidência de acidose láctica associada ao seu uso. A metformina (**Figura 2**), uma molécula menos lipofílica, demonstrou ser mais segura, sendo aprovada para uso clínico no Reino Unido, em 1958, no Canadá, em 1972, e nos Estados Unidos, em 1995 (WITTERS, 2001; SANTOMAURO JÚNIOR *et al.*, 2008).



Figura 1 – Espécie vegetal *Galega officinalis*

Fonte: BAILEY & DAY, 2004

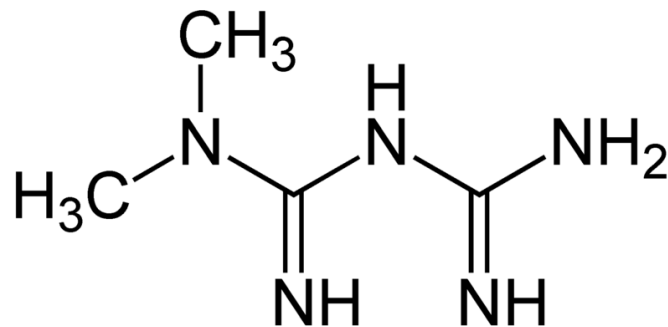


Figura 2 – Estrutura química da metformina

Apesar da aprovação para uso clínico de novos fármacos hipoglicemiantes, a metformina continua sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e há demonstração inequívoca de que reduz as complicações da doença (GALLEGO, 2005). A metformina apresenta atividade hipoglicemiante que não é resultado do estímulo à secreção de insulina, como observado para as sulfonilureias (KILO *et al.*, 2003). Outros benefícios induzidos pela metformina incluem discreta redução de massa corporal (STUMVOLL *et al.*, 1995) e das concentrações de ácidos graxos, triglicerídeos e LDL, o que contribui para redução do risco de doenças cardiovasculares (GALLEGO, 2005; GONG *et al.*, 2012).

No Brasil, a metformina é comercializada em comprimidos contendo 500, 850 e 1000 mg do fármaco. A relação nacional de medicamentos essenciais – RENAME – inclui o cloridrato de metformina como componente básico da assistência farmacêutica, sendo financiado pelo SUS (RENAME, 2015).

A metformina apresenta biodisponibilidade de 50 a 60% após administração por via oral sendo que aproximadamente 30% da dose administrada é eliminada nas fezes de forma inalterada. O tempo de meia-vida de eliminação desse fármaco é em média de 5 h em pacientes com função renal normal e a excreção é principalmente renal (RANG *et al.*, 2007; GRAHAM *et al.*, 2011; GONG *et al.*, 2012).

A metformina provoca alguns desconfortos gastrointestinais, como náusea, vômito, diarreia, flatulência e falta de apetite, especialmente no início do tratamento ou quando a dose é aumentada (RANG *et al.*, 2007). O tratamento crônico com metformina pode levar ao aumento das concentrações plasmáticas

de homocisteína e má absorção de vitamina B12 (BOLEN *et al.*, 2007). Além dessas reações adversas, a metformina pode induzir acidose láctica em pacientes com função renal comprometida, uma reação adversa mais grave, porém mais rara (SALPETER *et al.*, 2003; GONG *et al.*, 2012). As reações adversas leves e raras e a elevada atividade hipoglicemiante justificam o uso da metformina como fármaco de escolha para o tratamento de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (FORETZ *et al.*, 2014).

A metformina também é indicada para o tratamento de pacientes com síndrome do ovário policístico, principalmente em mulheres com alto índice de gordura corporal, pelo fato da resistência à insulina ser um fator fundamental (LORD *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006). Há estudos evidenciando ações benéficas da metformina em outras doenças que envolvem resistência à insulina, como a doença hepática gordurosa não-alcoólica (BUGIANESI *et al.*, 2005), esteato-hepatite não-alcoólica (MARCHESINI *et al.*, 2001) e na puberdade precoce (IBÁÑES *et al.*, 2006).

Apesar do extenso uso e dos benefícios e segurança comprovados, os mecanismos pelos quais a metformina exerce sua atividade hipoglicemiante ainda são incertos. As ações metabólicas responsáveis pelo efeito terapêutico desse fármaco parecem ser a redução da produção excessiva de glicose pelo fígado (gliconeogênese), a inibição, em menor proporção, da glicogenólise (ZHENG *et al.*, 2015), a diminuição da absorção de glicose no trato gastrointestinal e o aumento da utilização de glicose nos tecidos periféricos, além do aumento da sensibilidade dos tecidos à insulina (HUNDAL, 2000; ZHOU *et al.*, 2001; GRAHAM *et al.*, 2011).

Em 2001, Zhou *et al.* demonstraram, em ratos, que a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é o principal mecanismo molecular que contribui para o efeito induzido pela metformina sobre a síntese hepática de glicose, a captação de glicose pelo músculo esquelético e o metabolismo lipídico. Posteriormente, foi demonstrada a ativação da AMPK pela metformina

em tecidos humanos como músculo esquelético (MUSI *et al.*, 2002) e endotélio da aorta (ZANG *et al.*, 2004).

A AMPK é a enzima responsável pela manutenção da homeostasia energética celular (CARLING, 2004). A célula deve manter uma alta relação entre ATP e ADP para sobreviver, o que é obtido através da conversão de ADP e fosfato em ATP em processos catabólicos. Em outra via, o anabolismo converte ATP em ADP e fosfato. A AMPK é, então, o ponto-chave desse equilíbrio, sendo ativada em situações de desequilíbrio, seja quando há interferência na produção ou aumento do consumo de ATP (HARDIE, 2003; CARLING, 2004; SCHIMMACK *et al.*, 2006). Essa enzima induz efeitos sobre o metabolismo de glicose e lipídios e sobre a expressão gênica e a síntese proteica em diversos órgãos e tecidos como fígado, coração, pâncreas e tecidos adiposo e muscular esquelético (ZHOU *et al.*, 2001). Como é ativada pela redução do conteúdo energético celular, as principais ações da AMPK visam reduzir vias anabólicas, tais como a síntese de ácidos graxos e colesterol e a gliconeogênese, e aumentar o catabolismo, como a utilização de glicose pelas células (**Figura 3**) (HARDIE, 2003; CARLING, 2004). Essas ações se tornam particularmente importantes em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e explicam, em grande parte, as ações benéficas da metformina sobre esse distúrbio metabólico.

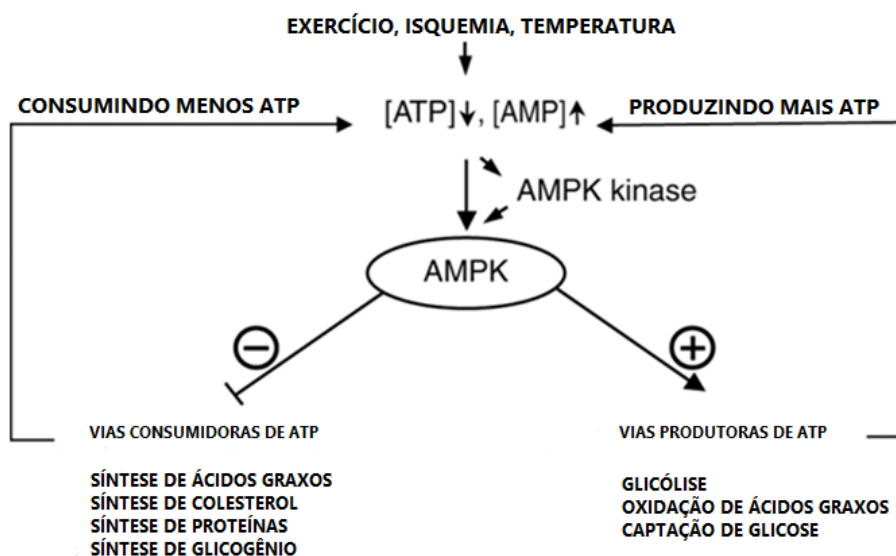


Figura 3 – Efeitos metabólicos da ativação da AMPK

Fonte: FREDERICH *et al.*, 2009 (Adaptado)

Estudos pré-clínicos tem demonstrado ações benéficas da metformina em modelos de inflamação. Li et al. (2009) demonstraram que a metformina inibe a progressão da aterosclerose e da hipercolesterolemia em coelhos, exercendo atividade cardioprotetora, através da inibição do NF- κ B, fator responsável pela transcrição de um grande número de genes, especialmente aqueles envolvidos em processos imunológicos e inflamatórios, apoptose e proliferação celular. A inibição do NF- κ B pela metformina envolve diretamente a ativação de AMPK (SAISHO, 2015). A inibição do NF- κ B também parece ser responsável pelo efeito inibitório induzido pela metformina sobre a resposta inflamatória associada a transformação e crescimento de células tumorais em camundongos (HIRSCH *et al.*, 2013).

A atividade anti-inflamatória da metformina parece resultar, em parte, da inibição da produção de mediadores inflamatórios. Estudo conduzido por Park et al. (2012) demonstrou que a metformina inibe a produção de mediadores inflamatórios como IL-6, TNF- α , fibrinogênio e fatores de crescimento associados ao remodelamento tecidual, além de inibir a produção de imunoglobulinas (Ig) tais como IgE e IgG. A redução da produção de TNF- α , um importante mediador inflamatório, também foi observada em estudo conduzido por Yuan et al. (2012). A metformina também reduz a produção de NO, um agente vasodilatador com importantes funções no processo inflamatório (KATO, 2010).

Além disso, Russe et al. (2013) demonstraram que a metformina é capaz de reduzir o tempo de lambida de pata na segunda fase do teste de formalina e reduzir a hiperalgesia e edema de pata induzidos por zimosano, evidenciando a atividade desse fármaco em modelos de dor inflamatória. Estudos publicados recentemente também demonstraram a atividade da metformina em modelos de dor e inflamação crônicas. Foi demonstrado que esse fármaco apresenta atividade em modelo de dor neuropática induzida por agentes quimioterápicos (MAO-YING *et al.*, 2014) e atenua a hiperalgesia e a alodínia em modelo de neuropatia diabética (MA *et al.*, 2015). Em adição, a metformina inibe a resposta inflamatória em modelos de artrite reumatoide em camundongos, um efeito associado à inibição da produção de citocinas inflamatórias e inibição da

diferenciação celular (KANG *et al.*, 2013). Sabe-se, também, que a metformina é capaz de inibir a diferenciação de monócitos em macrófagos via ativação da AMPK, um processo importante na cronificação da inflamação (VASAMSETTI *et al.*, 2015).

As implicações metabólicas da ativação da AMPK sobre a atividade do NF- κ B e a expressão de genes para mediadores inflamatórios tornam essa enzima um importante marcador do processo inflamatório (YAO *et al.*, 2012) e, conseqüentemente, indicam a metformina como um agente anti-inflamatório em potencial. Contudo, para o reposicionamento desse fármaco, são necessários estudos mais detalhados em diferentes modelos de dor e inflamação, caracterizando sua ação e evidenciando possíveis mecanismos de ação.

2 JUSTIFICATIVA

O reposicionamento de fármacos é uma vertente recente e bastante promissora da pesquisa científica. Essa abordagem tem se mostrado vantajosa para a indústria farmacêutica, uma vez que parâmetros como segurança e perfil farmacocinético de fármacos em uso clínico já estão previamente estabelecidos, reduzindo os custos com testes clínicos e o tempo para que nova abordagem farmacoterapêutica seja identificada e aprovada. Os fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas ainda apresentam limitações como eficácia reduzida ou segurança inadequada, principalmente durante o manejo de pacientes com doenças crônicas. Ensaio pré-clínicos demonstraram, recentemente, a atividade anti-inflamatória da metformina, porém essa não foi totalmente caracterizada e ainda há poucas evidências acerca da atividade antinociceptiva em modelos agudos e crônicos, bem como os mecanismos de ação que a mediaria. Nesse contexto, a investigação da atividade da metformina em modelos de dor e inflamação, assim como dos possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade, pode levar a melhor caracterização do seu perfil farmacológico e à perspectiva de seu reposicionamento no tratamento de pacientes com diversas condições inflamatórias e dolorosas.

3 OBJETIVO

Avaliar as atividades da metformina em modelos experimentais de inflamação aguda e dores nociceptiva, inflamatória e neuropática em camundongos, assim como investigar possíveis mecanismos que mediarão essas atividades.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (**Figura 4**) com massas entre 25 e 30 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos em sala com temperatura controlada de 27 ± 1 °C, a qual corresponde à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Foi mantido um ciclo claro/escuro de 12 h e água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Nos casos em que foi feita administração *per os* (*p.o.*) de fármacos e drogas para realização dos experimentos, a ração foi retirada 12 h antes do tratamento. Após o término dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG; protocolo n° 375/2014).



Figura 4 – Camundongo Swiss

Fonte: UFSJ – Linhagens de Animais.

4.2 Drogas, fármacos e reagentes diversos

- Albumina de soro bovino tipo V (BSA; Sigma-Aldrich, EUA) – Estabilizador da suspensão de células.
- Carboximetilcelulose (CMC; Galena, Brasil) – Veículo.

- Carragenina λ tipo IV (Sigma-Aldrich, EUA) – Estímulo nocivo/inflamatório.
- Cloridrato de cetamina (União Química, Brasil) – Anestésico.
- Cloridrato de ciproheptadina (Sigma-Aldrich, EUA) – Antagonista serotoninérgico.
- Cloridrato de metformina (Teuto, Brasil) – Fármaco aprovado para tratamento de pacientes com diabetes mellitus tipo 2.
- Cloridrato de naltrexona (Sigma-Aldrich, EUA) – Antagonista opioidérgico.
- Cloridrato de xilazina (União Química, Brasil) – Coadjuvante de anestesia.
- Dexametasona 21-fosfato dissódico (Sigma-Aldrich, EUA) – Anti-inflamatório esteroide.
- Dipirona sódica (Sanofi Aventis, Brasil) – Analgésico.
- Fenobarbital (Gardenal[®], Sanofi Aventis, Brasil) – Fármaco depressor do SNC.
- Formaldeído (Sigma-Aldrich, EUA) – Estímulo nocivo/inflamatório.
- Glibenclamida (Sigma-Aldrich, EUA) – Bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes.
- Indometacina (Sigma-Aldrich, EUA) – Anti-inflamatório não esteroide.
- Solução de cloreto de sódio 0,9% p/v (Sanobiol, Brasil) – Veículo.
- Solução de May-Grunwald – Corante para microscopia.
- Solução de Giemsa – Corante para microscopia.
- Solução de Turk – Solução diluidora de leucócitos.
- Solução tampão de PBS pH 7,4 – Veículo para administração de carragenina no modelo de pleurisia.

4.3 Preparo das soluções e suspensões, doses e vias de administração

Formaldeído:

A solução de formaldeído 0,92% foi preparada em solução de cloreto de sódio a 0,9% p/v, imediatamente antes de cada experimento. Foram injetados 20 μ L

dessa solução por via subcutânea (s.c.) na superfície plantar da pata posterior direita dos camundongos.

Carragenina:

As suspensões de carragenina foram preparadas em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, exceto para a avaliação da pleurisia, na qual esta foi preparada em solução tampão de PBS. Em ambos os casos, as suspensões foram preparadas no dia anterior ao experimento e armazenadas sob refrigeração. Foram injetados 30 μ L (600 μ g de carragenina) da suspensão a 2% por via intraplantar (i.pl.) na pata posterior direita dos camundongos ou 100 μ L (200 μ g) da suspensão a 0,2% na cavidade pleural dos animais.

Metformina:

Os comprimidos do medicamento cloridrato de metformina foram triturados e o pó obtido foi homogeneizado e guardado na geladeira em frasco âmbar, hermeticamente fechado. Foi realizada a correção da dose considerando a massa média dos comprimidos. As soluções contendo metformina foram preparadas em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v imediatamente antes de cada administração. As doses utilizadas foram de 250, 500 e 1000 mg/kg. A administração foi realizada *p.o.* no volume de 10 mL/kg, 1 h antes da avaliação da resposta (exceto nos protocolos de pós-tratamento). As doses foram definidas considerando-se estudos anteriores que avaliaram as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da metformina (MONTES *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2012; RUSSE *et al.*, 2013). O tempo entre a administração e a avaliação da resposta foi padronizado de acordo com a farmacocinética da metformina, considerando-se tempo médio de 1 h para atingir o pico de concentração plasmática em ratos (CHOI *et al.*, 2006).

Dipirona, dexametasona e indometacina:

As soluções foram preparadas imediatamente antes de cada administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. A dose de dipirona foi de 500 mg/kg. As doses de dexametasona e indometacina foram de 10 mg/kg. As soluções foram administradas *p.o.* em volume de 10 mL/kg. Dipirona, dexametasona e

indometacina foram utilizadas como controles positivos nos modelos de placa quente, edema e alodínia mecânica, respectivamente. Assim como a metformina, os controles positivos foram administrados 1 h antes da avaliação da resposta referente ao modelo em questão.

Fenobarbital:

A solução de fenobarbital foi preparada pela diluição do medicamento em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. A dose utilizada foi de 40 mg/kg, *p.o.*, em volume de 10 mL/kg. O fenobarbital foi utilizado como controle positivo no modelo de haste girante e administrado 1 h antes da avaliação da coordenação motora, assim como a metformina.

Naltrexona:

A solução de naltrexona foi preparada imediatamente antes da administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses utilizadas foram de 5 e 10 mg/kg, sendo administradas por via intraperitoneal (*i.p.*) em volume de 4 mL/kg.

Glibenclamida e ciproheptadina:

As suspensões foram preparadas imediatamente antes de cada administração em suspensão de CMC 1% p/v em cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses de glibenclamida foram de 20 e 40 mg/kg e as doses de ciproheptadina foram de 5 e 10 mg/kg. As suspensões foram administradas *p.o.* em volume de 10 mL/kg.

4.4 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor

A avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor foi realizada utilizando-se placa quente (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil – **Figura 5**). O modelo de placa quente foi originalmente descrito por Woolfe & MacDonald (1944). Entretanto, no presente estudo, foi usada uma modificação do modelo original descrita por Eddy & Leimbach (1953). Os animais foram colocados sob a superfície não aquecida da placa durante 2 min para ambientação nos dois dias anteriores ao experimento. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de modo que as massas corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes, sendo que para cada grupo experimental

foram utilizados oito animais. Para a realização do teste, os camundongos foram colocados, individualmente, sobre a placa metálica aquecida na temperatura estabelecida e o tempo para que os animais exibissem comportamentos indicativos de desconforto (lambida das patas ou saltos) foi determinado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. A temperatura utilizada foi de 50 °C e o tempo de corte foi de 50 s a fim de evitar a ocorrência de lesão tecidual (**Figura 6**). A metformina foi administrada *p.o.* nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/kg, 1 h antes da realização do experimento.

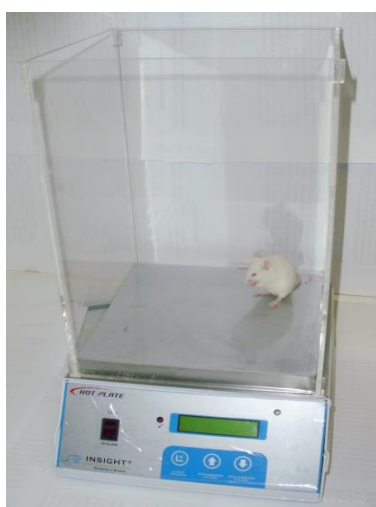


Figura 5 - Aparato utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor.

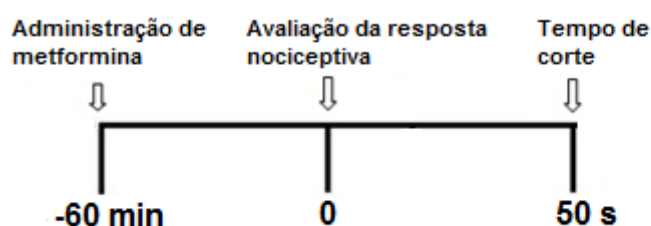


Figura 6 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre a resposta nociceptiva induzida por calor em camundongos.

4.5 Avaliação da alodínia mecânica induzida por carragenina

Para a avaliação da alodínia mecânica, foi utilizado o procedimento descrito por Souza et al. (2002) com algumas modificações. Os camundongos foram

colocados em compartimentos de acrílico dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. Os animais foram ambientados no aparato em duas sessões diárias de 60 min cada, durante dois dias antes da realização do experimento e em uma sessão de 10 min, imediatamente antes do experimento. A alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital (Insight Ltda., Ribeirão Preto, Brasil), o qual permite determinar o limiar para a retirada da pata, que é expresso em gramas (g). Uma ponteira de polietileno, acoplada a um braço transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N), foi pressionada sobre o centro da superfície plantar da pata posterior direita de cada animal (**Figura 7**) e um aumento gradual de pressão foi feito até que o animal retirasse a pata. O valor indicando a pressão que fez com que o animal removesse a pata foi registrado automaticamente. Para cada animal, foram feitas cinco medições em intervalos de 20 s descartando-se o maior e o menor valor e calculando-se o limiar nociceptivo como a média das três medidas restantes. O limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado no dia anterior ao teste e a divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os limiares basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental, foram utilizados sete a oito animais.



Figura 7 – Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica. PP - ponteira de polietileno; TF - transdutor de força. O sítio de estimulação é o centro delimitado pelos pontos pretos.

A atividade da metformina nesse modelo experimental foi avaliada por meio de dois diferentes protocolos. No primeiro protocolo, a metformina foi administrada *p.o.* nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/kg, 1 h antes da administração *i.pl.* da carragenina, e a avaliação da alodínia mecânica foi feita 2, 4 e 6 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 8**). No segundo protocolo, a metformina foi administrada *p.o.*, nas mesmas doses, 1 h após a injeção de carragenina e a alodínia foi avaliada 2, 4 e 6 h após a injeção do fármaco, o que corresponde a 3, 5 e 7 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 9**).



Figura 8 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (primeiro protocolo).



Figura 9 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (segundo protocolo).

4.6 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído

A avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído foi realizada conforme proposto por Tjølsen et. al. (1992). Cada animal foi colocado sob um funil de vidro (18 cm de diâmetro e 14 cm de altura) para ambientação por cerca de 10 min, imediatamente antes da administração de formaldeído

(Figura 10). A divisão dos grupos foi feita de forma que as massas corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes, sendo utilizados nove animais para cada grupo experimental. A metformina foi administrada *p.o.* nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/kg, 1 h antes da injeção de formaldeído. A duração do comportamento de lambida após a injeção *s.c.* de formaldeído foi determinada nos períodos de 0-5 min e de 15-30 min, que correspondem à primeira e à segunda fase da resposta nociceptiva, respectivamente (Figura 11). Nesse modelo, o controle da temperatura ambiente (27-28 °C) é importante, pois a duração do comportamento de lambida durante a segunda fase da resposta nociceptiva é bastante reduzida quando o experimento é realizado em temperatura inferior a 23 °C (TJØLSEN *et al.*, 1992). Os resultados foram expressos como o tempo durante o qual os animais apresentaram o comportamento de lambida da pata injetada, durante a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva.



Figura 10 - Aparato utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

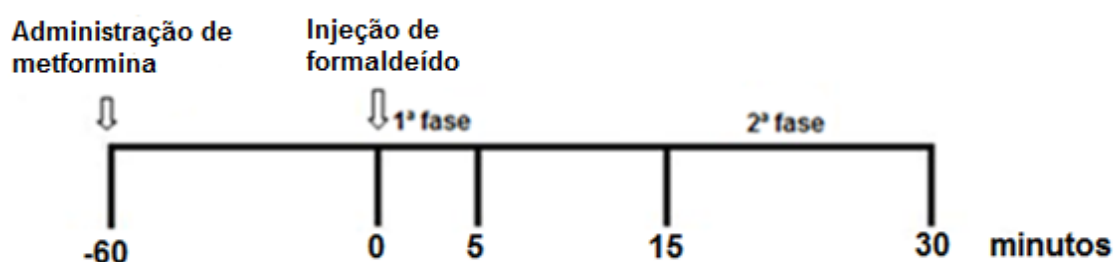


Figura 11 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos.

4.7 Avaliação da alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático

O procedimento cirúrgico de constrição do nervo isquiático em camundongos foi baseado na técnica descrita por Bennett & Xie (1988) com pequenas modificações propostas por Motta et al. (2011). Os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de uma solução contendo cetamina (90 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg). Em seguida, por meio de uma incisão na região do bíceps femoral, previamente tricotomizada e higienizada com iodopolividona 10% p/v, um segmento do nervo isquiático foi exposto. Foram feitas três ligaduras no segmento exposto do nervo, espaçadas em 1 mm, com fio Cat-Gut 5.0 cromado (Brasuture, São Sebastião do Grama, Brasil). A força de constrição foi exercida de forma a não impedir a circulação sanguínea pela vasculatura superficial epineural e todo o procedimento foi realizado de forma a evitar lesões nos nervos ou em regiões próximas que pudessem afetar a atividade motora dos animais ou causar lesão muscular. Para a padronização, foram utilizados dois grupos controle: o grupo controle 1 (intacto), composto por animais não submetidos a qualquer intervenção cirúrgica, e grupo controle 2 (falso-operado), composto por animais submetidos a uma falsa cirurgia, na qual o nervo não foi constringido, apenas visualizado.

Nos experimentos subsequentes à padronização, foram utilizados apenas animais submetidos à cirurgia (operados). Para cada grupo experimental, foram

utilizados sete a nove animais. A alodínia mecânica foi avaliada conforme o protocolo descrito na seção 4.5. No dia anterior à realização da cirurgia, o limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os limiares basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Após sete dias de realização da cirurgia, a metformina foi administrada durante três dias *p.o.* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg e a alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 horas após a administração do fármaco. O limiar basal de retirada de pata também foi avaliado em cada dia antes da administração de metformina, a qual foi realizada sempre no mesmo horário em cada dia a fim de reduzir possíveis erros experimentais devido a alterações comportamentais dos animais durante o dia.

4.8 Avaliação da atividade motora

A coordenação motora dos camundongos foi avaliada na haste girante (**Figura 12**), de acordo com o procedimento proposto por Vaz et al. (1996), que representa uma modificação daquele originalmente descrito por Dunham & Miya (1957). Durante três dias antes do experimento, cada animal foi treinado no aparato durante 2 min em uma sessão diária. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias dos tempos de permanência basais fossem semelhantes. No dia do experimento, os animais foram tratados com os compostos e reavaliados no aparato a 14 rpm, determinando-se o tempo de permanência. O tempo de corte foi de 2 min. A metformina foi administrada *p.o.* nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/kg, 1 h antes da avaliação na haste girante (**Figura 13**).



Figura 12 – Haste girante utilizada para avaliar a atividade motora de camundongos.

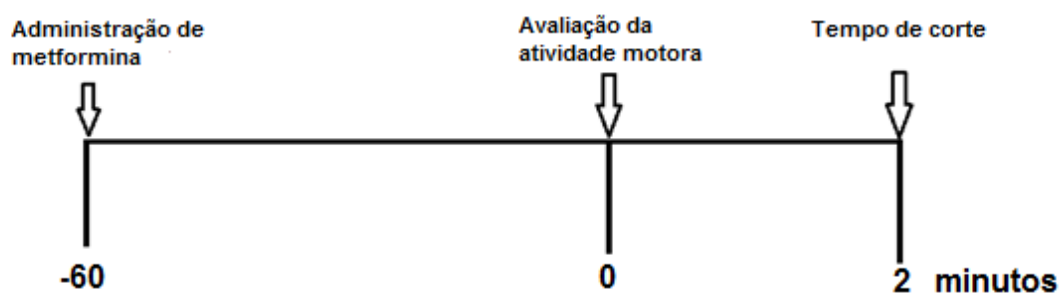


Figura 13 – Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pela metformina ou pelo fenobarbital sobre a coordenação motora.

4.9 Avaliação do edema de pata induzido por carragenina

O volume de pata dos animais foi avaliado através de um pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália) conforme o método descrito por Ferreira (1979). Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. A solução utilizada constitui-se de água destilada, cloreto de sódio 0,9% p/v e um tensoativo (detergente comum). Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo (**Figura 14**). Após ter sido calibrado, o aparelho converte o

deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital. Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-tarsal, um pedal é pressionado pelo experimentador, que fixa o valor do volume observado. O volume de pata basal de cada animal foi medido no dia anterior ao experimento. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os volumes de pata basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental foram utilizados de sete a oito animais.

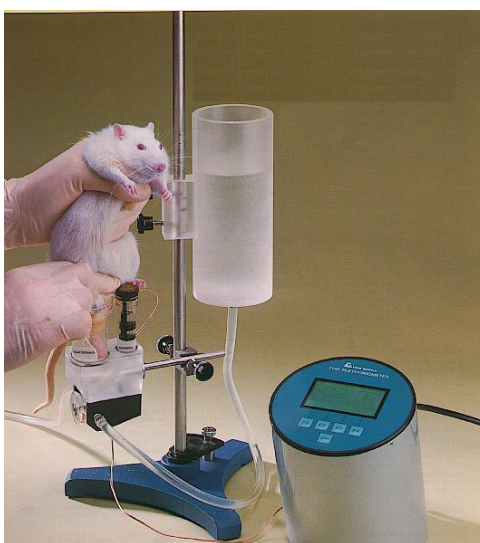


Figura 14 - Aparato utilizado para a avaliação do edema de pata.

A atividade da metformina nesse modelo experimental foi avaliada por meio de dois diferentes protocolos. No primeiro protocolo, a metformina foi administrada *p.o.* nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/kg, 1 h antes da administração *i.pl.* da carragenina, e a avaliação do edema foi feita 2, 4 e 6 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 15**). No segundo protocolo, a metformina foi administrada *p.o.*, nas mesmas doses, 1 h após a injeção de carragenina e o edema foi avaliado 2, 4 e 6 h após a injeção do fármaco, o que corresponde a 3, 5 e 7 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 16**). As medições foram feitas em triplicata, sendo o resultado final obtido pela média das duas leituras mais próximas.



Figura 15 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre o edema de pata induzido por carragenina (primeiro protocolo).



Figura 16 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina sobre o edema de pata induzido por carragenina (segundo protocolo).

4.10 Avaliação da pleurisia induzida por carragenina

O objetivo desse ensaio foi avaliar a atividade da metformina sobre o acúmulo de leucócitos induzida por carragenina na pleura de camundongos, seguindo o procedimento padronizado por Matsui et al. (2015). Os camundongos foram imobilizados e a carragenina foi administrada na cavidade pleural com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha adaptada para esse procedimento. Desse modo, seringas de 1 mL com agulhas calibre 0,38 x 13 mm foram adaptadas para medir aproximadamente 3 mm de comprimento, objetivando não aprofundar na cavidade pleural além do necessário. A agulha foi introduzida do lado direito da cavidade torácica dos animais para a injeção de carragenina ou de PBS estéril nos animais dos grupos controles. A metformina foi administrada 1 h antes da indução da pleurisia nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg. A coleta dos leucócitos foi realizada 4 h após a administração de carragenina (**Figura 17**). Para esse procedimento, a cavidade pleural dos animais foi lavada com 1 mL de solução de BSA 0,1% em PBS sendo recolhido

e reintroduzido três vezes. O procedimento foi repetido com mais 1 mL da solução anterior, totalizando 2 mL de lavado pleural. Uma alíquota de 1,5 mL desse lavado foi centrifugada (a 4 °C, 100 G, por 6 min), o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas com 100 µL de BSA 3%. Uma alíquota de 20 µL da solução obtida anteriormente foi diluída em 180 µL de solução de Turk para a realização da contagem total de leucócitos utilizando câmaras de Neubauer e um microscópico óptico. Dessa solução, 40-50 µL da solução de células foram cito-centrifugadas em lâminas de vidro e papel absorvente (100 rpm por 40 s) para a contagem de células. Após secagem, as lâminas foram coradas com soluções de May-Grunwald e Giemsa e foram feitas as contagens de células mononucleares (macrófagos, monócitos e linfócitos) e neutrófilos no aumento de 1000 vezes no microscópico óptico.

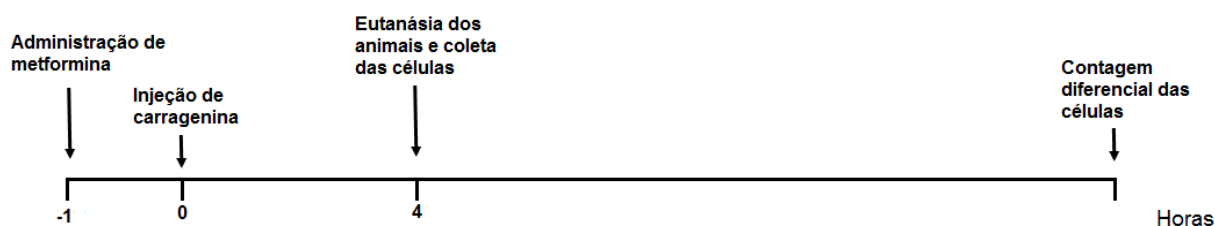


Figura 17 - Escala temporal de pré-tratamento dos animais com metformina *p.o.* e administração de carragenina por via intrapleural no modelo de pleurisia.

4.11 Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva da metformina

Com o objetivo de avaliar possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva da metformina no modelo de placa quente, foram utilizados um antagonista opioidérgico (naltrexona), um antagonista serotoninérgico (ciproheptadina) e um bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes (glibenclamida). Naltrexona (- 15 min) foi administrada por via *i.p.* (**Figura 18**), enquanto glibenclamida e ciproheptadina (- 30 min) foram administrados *p.o.* (**Figura 19**), previamente à administração de metformina. Os animais foram avaliados na placa quente 1 h após a administração de metformina. O tempo de corte foi de 50 s.



Figura 18 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina, após tratamento prévio com naltrexona, sobre a nocicepção induzida por calor em camundongos.

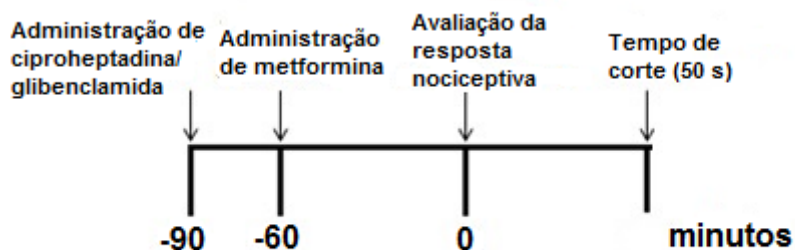


Figura 19 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina, após tratamento prévio com glibenclamida ou ciproheptadina, sobre a nocicepção induzida por calor em camundongos.

4.12 Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade antialodínica da metformina

Com o objetivo de avaliar possíveis mecanismos envolvidos na atividade da metformina no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina, foram utilizados antagonistas opioidérgico (naltrexona) ou serotoninérgico (ciproheptadina) e um bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes (glibenclamida). Naltrexona (- 15 min) foi administrada por via i.p. (**Figura 20**), enquanto glibenclamida e ciproheptadina (- 30 min) foram administradas *p.o.* (**Figura 21**), previamente à administração de metformina. Carragenina foi injetada 1 h após a administração de metformina e a alodínia mecânica foi avaliada 2, 4 e 6 h após.

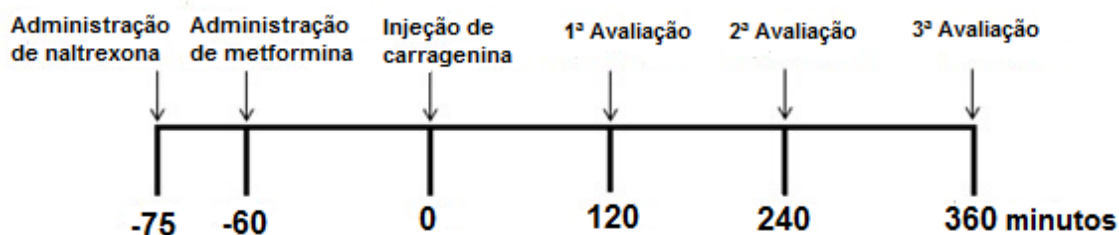


Figura 20 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina, após tratamento prévio com naltrexona, sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.

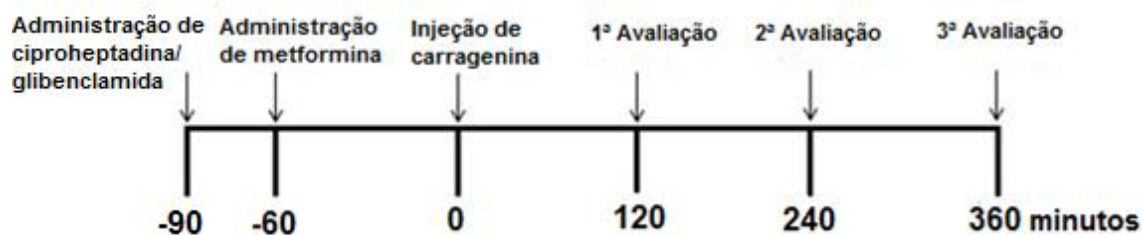


Figura 21 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela metformina, após tratamento prévio com glibenclamida ou ciproheptadina, sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados referentes aos modelos de placa quente, formaldeído, pleurisia e haste girante foram analisados por meio da análise de variância simples, seguida pelo teste Newman-Keuls, que compara todos os grupos experimentais entre si. Os resultados referentes aos modelos de alodínia mecânica, edema e dor neuropática foram analisados por meio da análise de variância de duas vias, seguida pelo teste Bonferroni, exceto os resultados referentes à área sob a curva (AUC) dos respectivos testes, as quais foram analisadas conforme descrito para os modelos anteriores. O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística e apresentação gráfica dos resultados foram feitas por meio do programa *Graphic Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito induzido pela metformina sobre a resposta nociceptiva induzida por calor

A resposta nociceptiva induzida por calor foi avaliada como a latência para o animal apresentar comportamento indicativo de dor após exposição à placa quente, tais como: lambear as patas anteriores ou posteriores, saltar ou esfregar as patas anteriores uma na outra. O grupo controle teve uma latência média de aproximadamente 14 s. O grupo tratado com dipirona, controle positivo do experimento, teve uma latência média de 25 s, estatisticamente maior que o do grupo controle. A metformina inibiu a latência para a observação da resposta nociceptiva induzida pelo calor. As latências médias dos grupos tratados com as doses de 500 e 1000 mg/kg foram, aproximadamente, 23 e 24 s, respectivamente. Esses valores diferem estatisticamente daquele do grupo controle. A dose de 250 mg/kg não inibiu a resposta nociceptiva. A latência média do grupo tratado com essa dose foi de 14 s, que não diferiu estatisticamente daquela do grupo controle (**Figura 22**).

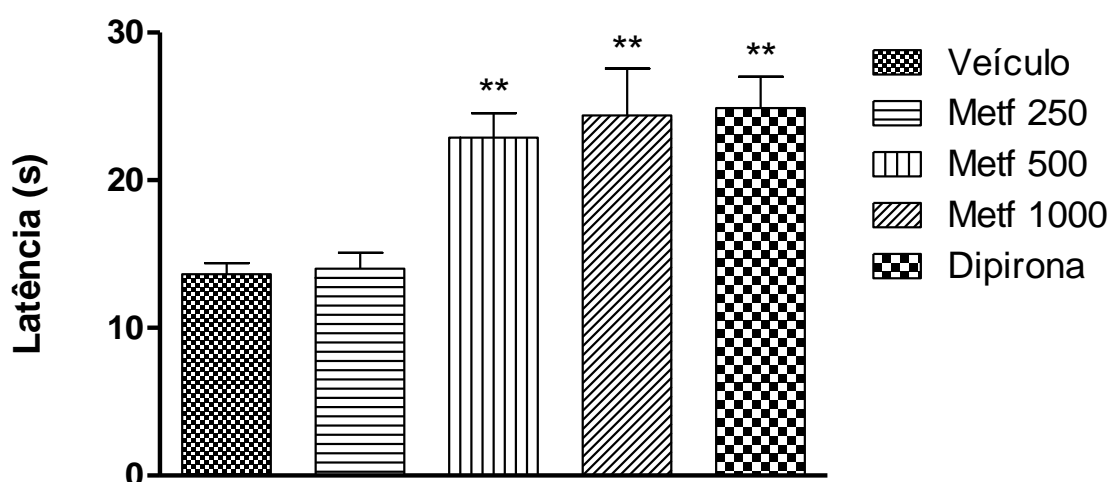


Figura 22 - Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, -1 h) ou pela dipirona (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente (50° C). ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). $n = 8$.

5.2 Efeito induzido pela metformina sobre resposta a nociceptiva induzida por formaldeído

A administração i.pl. de formaldeído na pata posterior direita dos camundongos induziu um comportamento nociceptivo caracterizado por lambida, flexão da pata e manutenção desta fora de contato com a superfície. Para a avaliação, foi considerada apenas a duração do comportamento de lambida de pata. A duração média do comportamento de lambida do grupo controle (veículo), tratado com solução salina 0,9% *p.o.*, foi de, aproximadamente, 86 e 156 s na primeira e na segunda fase, respectivamente. A metformina, na dose de 1000 mg/kg, inibiu a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído tanto na primeira quanto na segunda fase, reduzindo a duração do comportamento de lambida para 42 s e 2 s, respectivamente (**Figura 23**).

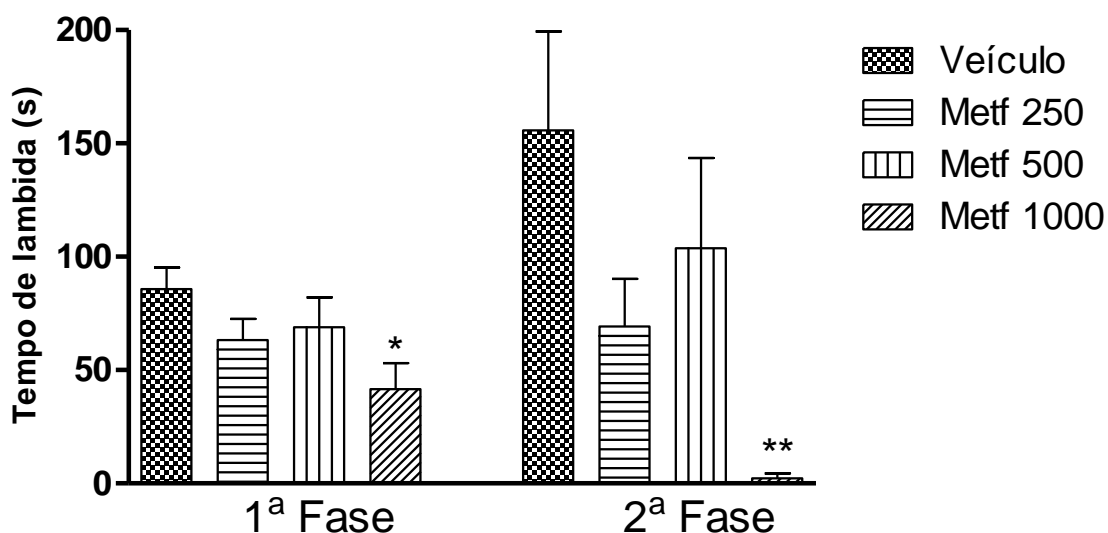


Figura 23 - Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre o comportamento de lambida de pata induzido por formaldeído em camundongos. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n=9$.

5.3 Efeito induzido pela metformina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina

A atividade da metformina em modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina foi avaliada por meio de dois protocolos. No primeiro protocolo, foi feita a administração de metformina 1 h antes da injeção i.pl. de carragenina. O grupo controle com carragenina apresentou uma diminuição acentuada do

limiar nociceptivo que tinha um valor basal de 7,4 g e passou para aproximadamente 2,8 g após a injeção do estímulo inflamatório. Nesse protocolo, a metformina, nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica induzida pela carragenina. A dose de 250 mg/kg reduziu a alodínia apenas na 2ª h após a administração de carragenina, sendo que o limiar médio observado foi de aproximadamente 3,9 g. A dose de 500 mg/kg reduziu a alodínia na 2ª e na 4ª h. Os limiares médios observados foram de 5,4 e 3,6 g, respectivamente. A dose de 1000 mg/kg reduziu a alodínia de forma mais acentuada em todos os momentos de avaliação, com limiares médios de 5,5, 5,0 e 4,0 g na 2ª, na 4ª e na 6ª h, respectivamente. A indometacina foi utilizada como controle positivo do experimento. O tratamento com esse fármaco reduziu a alodínia mecânica induzida pela carragenina na 2ª e na 4ª h. Os limiares observados para esse grupo (3,9 g na 2ª h e 4,0 g na 4ª h) foram estatisticamente maiores do que o limiar médio observado para o grupo controle (**Figura 24**).

No segundo protocolo, a metformina foi administrada 1 h após a injeção de carragenina. A média dos valores basais de limiar nociceptivo foi de aproximadamente 7 g para todos os grupos experimentais. No grupo controle com carragenina, os valores observados após a injeção do estímulo inflamatório foram 3,4, 2,8 e 2,6 g na 2ª, na 4ª e na 6ª h, respectivamente. A administração de metformina atenuou a alodínia mecânica induzida pela carragenina apenas na dose de 1000 mg/kg, elevando o limiar nociceptivo para 4,4, 4,5 e 3,8 g, na 2ª, na 4ª e na 6ª h após a administração do estímulo inflamatório, respectivamente. O tratamento com indometacina reduziu a alodínia mecânica na 2ª, na 4ª e na 6ª h. Os limiares médios observados foram de 5,9, 4,5 e 4,7 g, respectivamente. Esses valores são estatisticamente maiores que o limiar médio do grupo controle com carragenina (**Figura 25**). No entanto, os valores referentes à área sob a curva para as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg (**Figura 25B**) foram estatisticamente diferentes quando comparados ao grupo controle. Portanto, em uma análise global, todas as doses de metformina (250, 500 e 1000 mg/kg) atenuaram a alodínia mecânica induzida por carragenina.

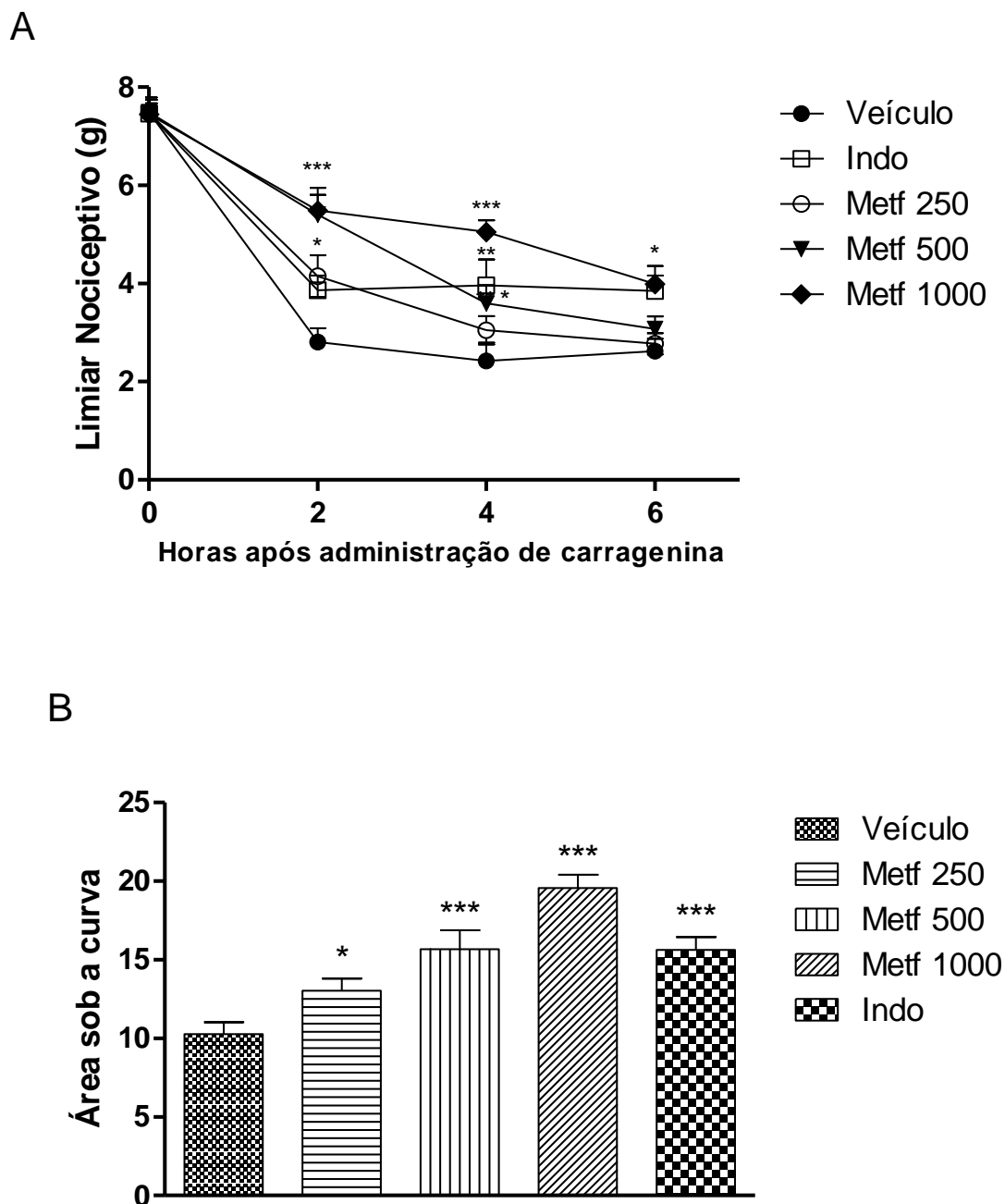


Figura 24 - Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, -1 h) ou pela indometacina (Indo; 10 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ $p < 0,001$, respectivamente). $n=8$.

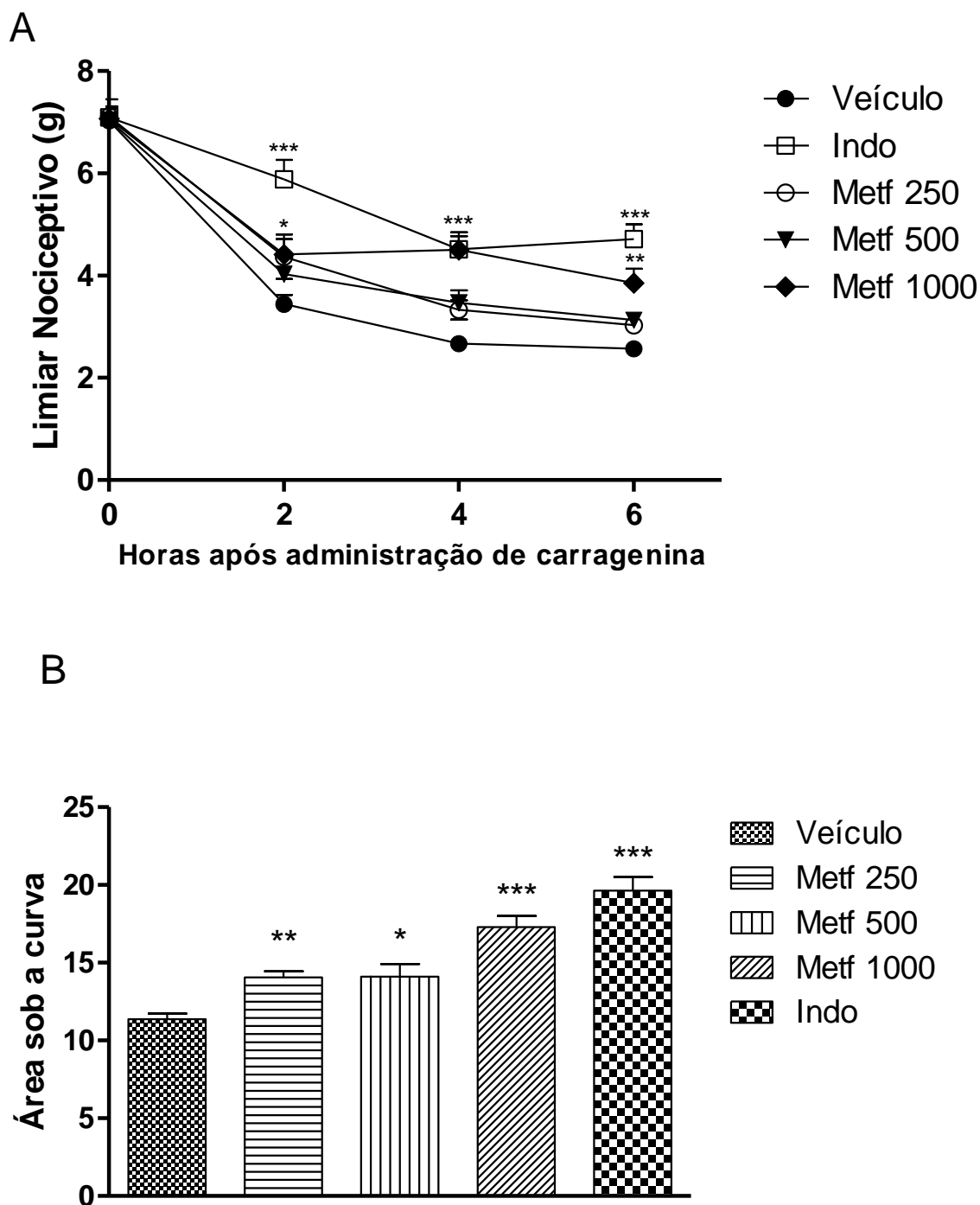


Figura 25 - Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, 1 h) ou pela indometacina (Indo; 10 mg/kg, *p.o.*, 1 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 7$.

5.4 Efeito induzido pela metformina sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático

Primeiramente, foi realizada a padronização do modelo de dor neuropática induzida por constrição do nervo isquiático. Para tal, o limiar nociceptivo avaliado por meio da estimulação da pata ipsilateral à constrição do nervo isquiático, foi medido no dia seguinte à cirurgia e, posteriormente, a cada dois dias durante um período de 15 dias. Nessa avaliação, observou-se que a alodínia mecânica se estabeleceu no 1º dia após a cirurgia e manteve-se durante todo o período avaliado. Os valores basais do limiar nociceptivo reduziram de aproximadamente 6,7 g para aproximadamente 3,5 g no grupo submetido à cirurgia. Nos grupos controles (grupo controle 1, sem intervenção, e grupo controle 2, submetido à falsa cirurgia), os valores variaram entre 6,0 e 6,7 g sem, no entanto, diferirem estatisticamente entre si (**Figura 26**).

A metformina, administrada a partir do 7º dia após o procedimento cirúrgico, atenuou a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático. No 7º dia, o limiar nociceptivo para o grupo controle foi de 3,6; 3,6; 3,1 e 2,8 g na 1ª, na 3ª, na 5ª e na 7ª h após administração do fármaco, respectivamente. Nesta avaliação, a metformina na dose de 1000 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica, considerando-se uma avaliação global (**Figura 27**). No 8º dia, o limiar nociceptivo para o grupo controle permaneceu em torno de 3,2 g em todos os momentos da avaliação. A metformina, na dose de 500 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica na 3ª e 5ª h após a administração do fármaco (limiares médios de 4,3 e 4,4 g, respectivamente). Na dose de 1000 mg/kg, a metformina atenuou a alodínia mecânica em todo o período de avaliação. Os limiares médios observados foram de 4,9; 5,3; 5,1 e 4,5 g, na 1ª, na 3ª, na 5ª e na 7ª h após administração do fármaco, respectivamente. Em uma avaliação global, também foi observada a atividade da metformina na dose de 250 mg/kg (**Figura 28**). No 9º dia, o limiar nociceptivo para o grupo controle permaneceu em torno de 3,1 g em todos os momentos da avaliação. A metformina, apenas na dose de 1000 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica na 1ª, na 3ª e na 5ª h após a administração do fármaco. Os limiares médios observados foram de 4,3; 4,6 e 4,4 g, respectivamente (**Figura 29**).

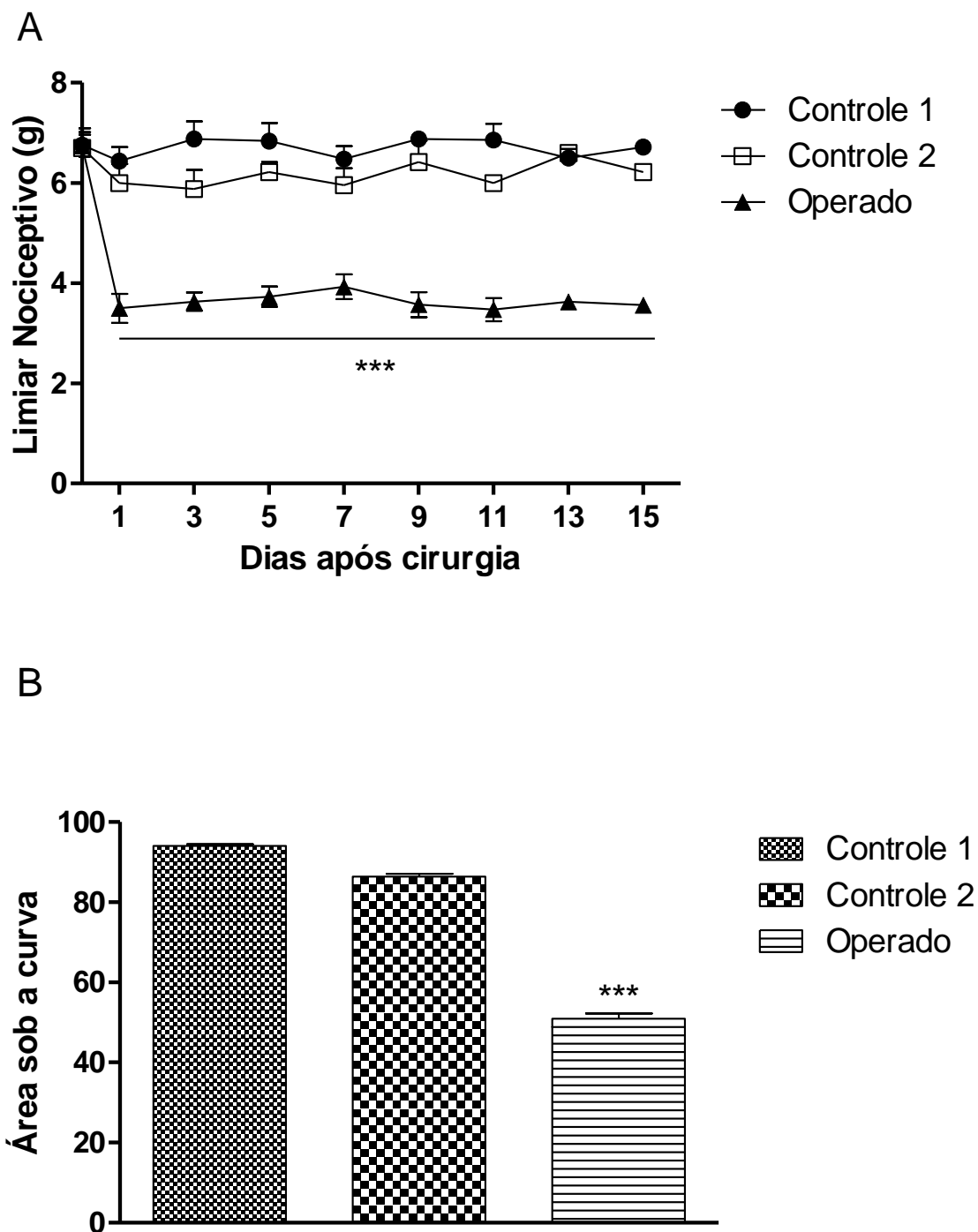


Figura 26 – Alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático. Controle 1: grupo de animais sem intervenção. **Controle 2:** grupo de animais falso-operados. **Operados:** grupo de animais submetidos à cirurgia. **(A)** Curso temporal e **(B)** área sob a curva. *** indica diferença estatística em comparação com os grupos controle ($p < 0,001$). $n = 7-9$.

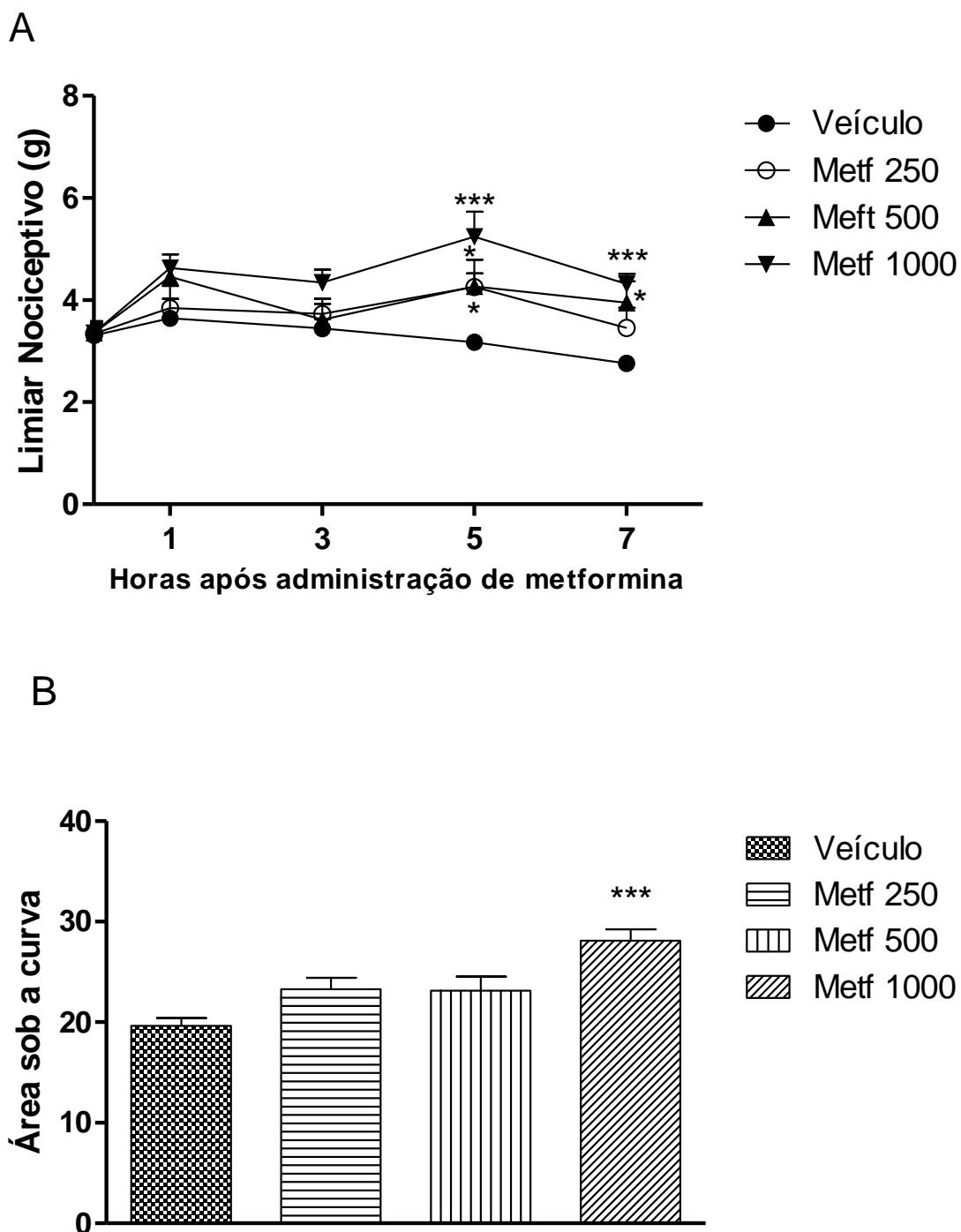


Figura 27 – Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, 7º dia após cirurgia) sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. * e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 7-9$.

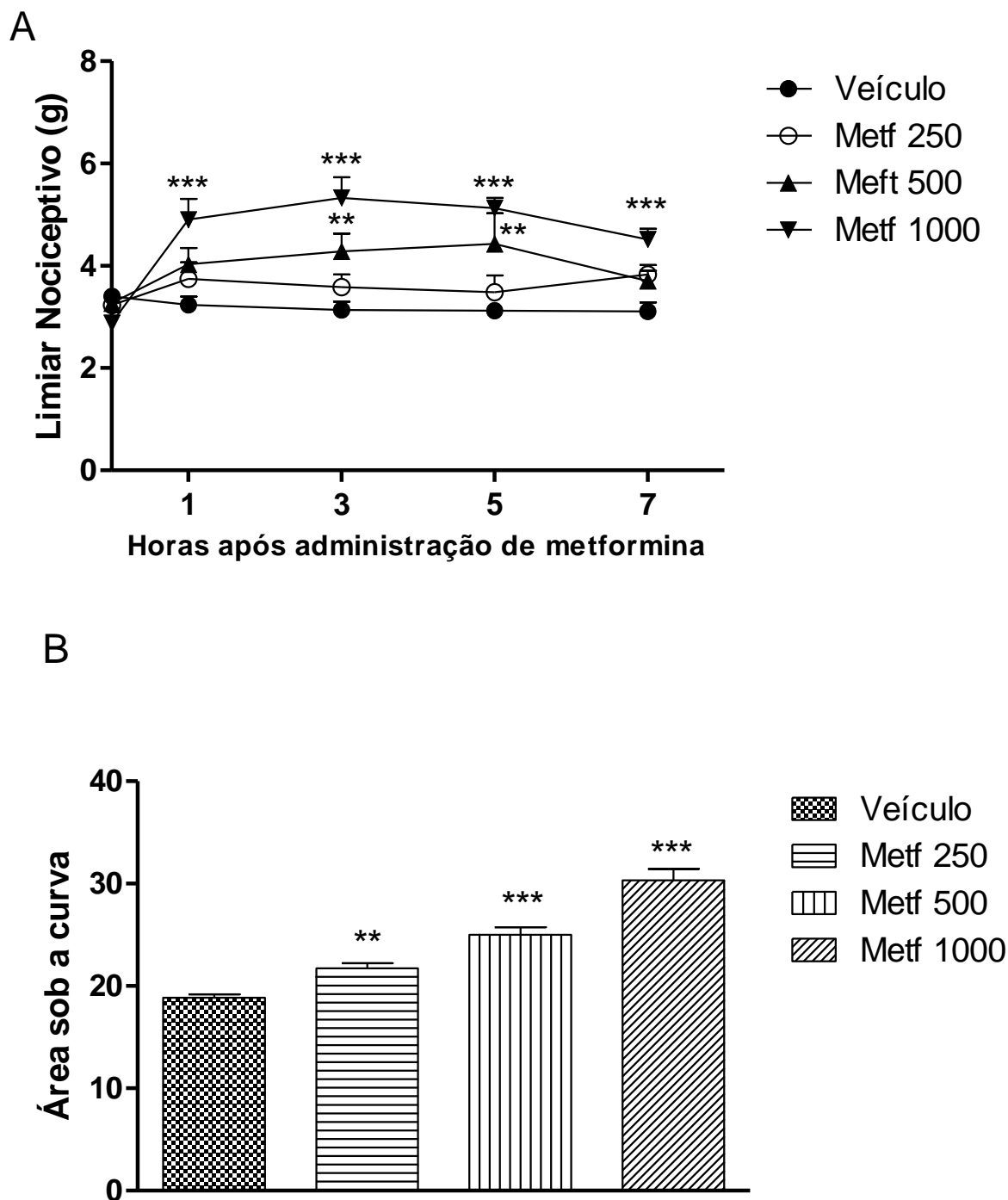


Figura 28 – Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, 8º dia após cirurgia) sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 7-9$.

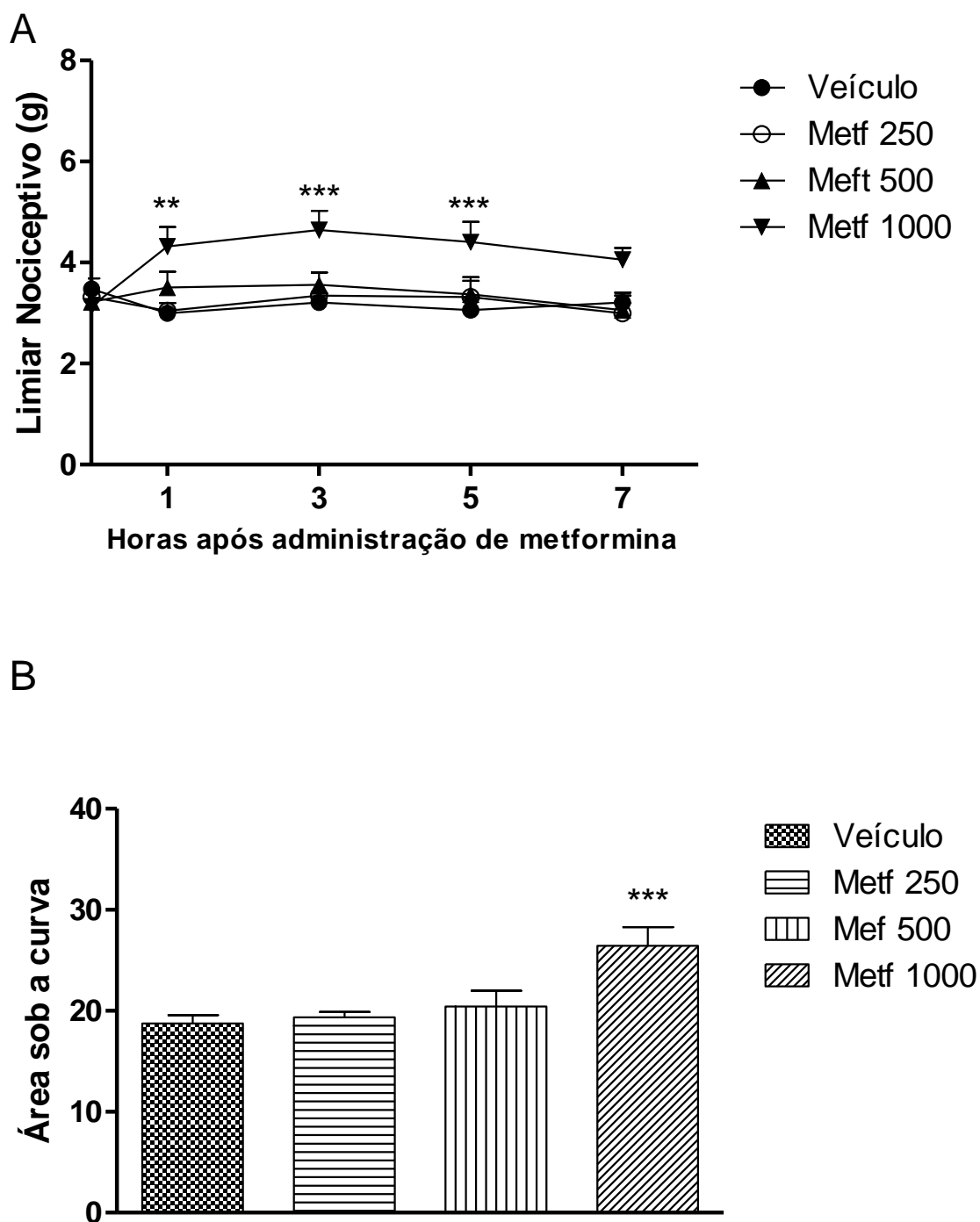


Figura 29 – Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, 9º dia após cirurgia) sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 7-9$.

5.5 Efeito induzido pela metformina sobre a atividade motora

A atividade motora dos camundongos foi avaliada na haste girante com o objetivo de validar os resultados obtidos nos modelos de dor. A metformina, nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, ou o veículo (grupo controle) não alteraram o tempo de permanência dos animais na haste girante. Entretanto, o fenobarbital reduziu significativamente esse tempo para aproximadamente 22 s (Figura 30).

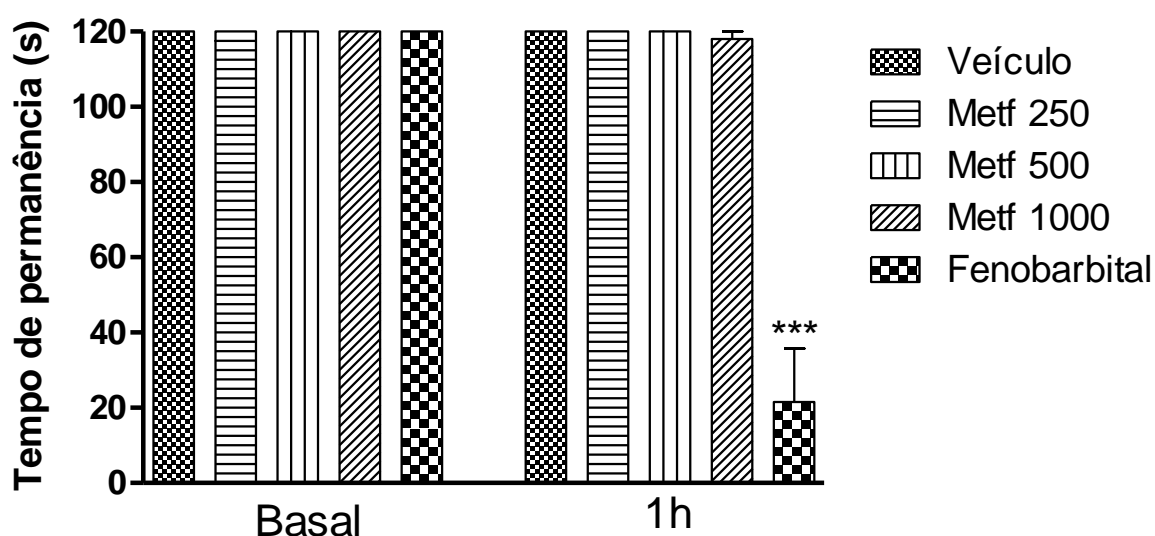


Figura 30 – Efeito induzido pela metformina (250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, -1 h) ou pelo fenobarbital (40 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n = 8$.

5.6 Efeito induzido pela metformina sobre o edema de pata induzido por carragenina

A atividade da metformina no modelo de edema de pata induzido por carragenina foi avaliada por meio de dois protocolos. No primeiro protocolo, a metformina foi administrada 1 h antes da injeção de carragenina. A injeção *i.pl.* de carragenina induziu edema de pata acentuado. No grupo controle com carragenina, as variações médias do volume da pata dos animais foram de 39, 83 e 51 μL na 2^a, na 4^a e na 6^a h, respectivamente. O tratamento com dexametasona inibiu a formação do edema de pata induzido por carragenina. As variações médias de volume de pata do grupo de animais que recebeu esse tratamento foram de 16 μL na 4^a h e 6 μL na 6^a h. A metformina reduziu o

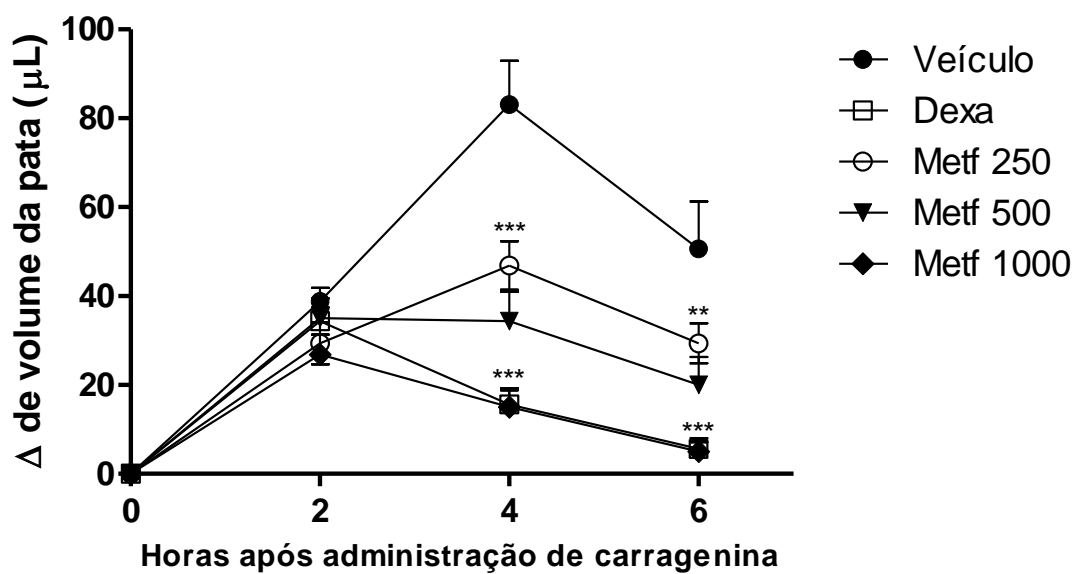
edema de pata induzido por carragenina. Para as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, os valores médios de variação do volume da pata foram de 47, 34 e 15 μL , respectivamente, na 4^a h e 29, 20 e 5 μL , respectivamente, na 6^a h após a administração de carragenina (**Figura 31**).

No segundo protocolo, a metformina foi administrada 1 h após a injeção de carragenina. Nesse protocolo, os valores médios de variação do volume da pata dos animais do grupo controle com carragenina foram de 61, 124 e 131 μL na 2^a, na 4^a e na 6^a após a administração de carragenina, respectivamente. O tratamento com dexametasona atenuou o edema de pata induzido por carragenina, sendo que as variações médias do volume de pata desses animais foram de 47 e 27 μL na 4^a e na 6^a h, respectivamente. O tratamento com metformina atenuou o edema de pata induzido por carragenina. Para as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, os valores médios de variação do volume da pata foram de 92, 59 e 44 μL , respectivamente, na 4^a h e 70, 67 e 30 μL , respectivamente, na 6^a h após a administração de carragenina (**Figura 32**).

5.7 Efeito induzido pela metformina sobre a pleurisia induzida por carragenina

A injeção de carragenina induziu intenso acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos, na cavidade pleural dos camundongos. O acúmulo celular após a injeção intrapleural de PBS foi significativamente menor que aquele induzido por carragenina, indicando não haver interferência do veículo na migração celular. O pré-tratamento com metformina, na dose de 1000 mg/kg, reduziu significativamente o acúmulo de leucócitos totais e neutrófilos induzido por carragenina (**Figura 33**).

A



B

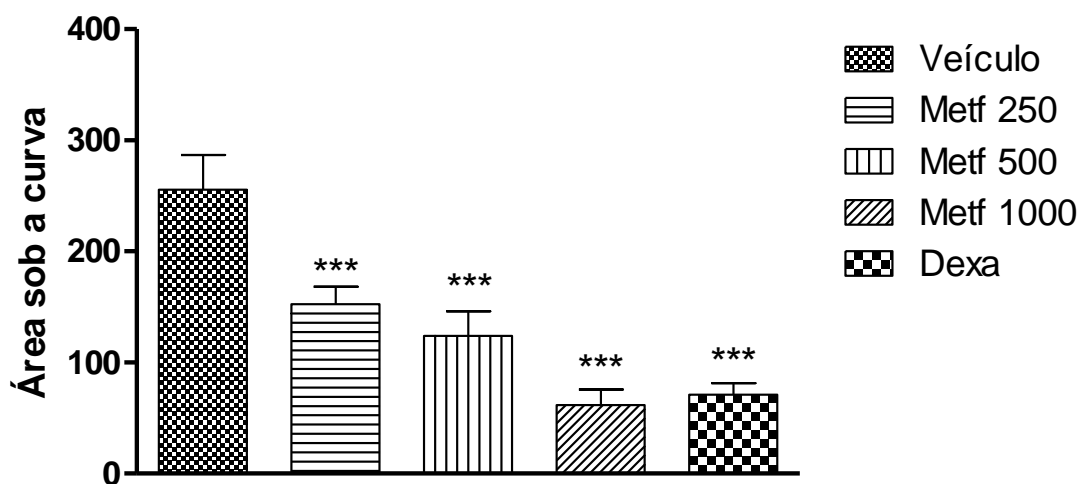
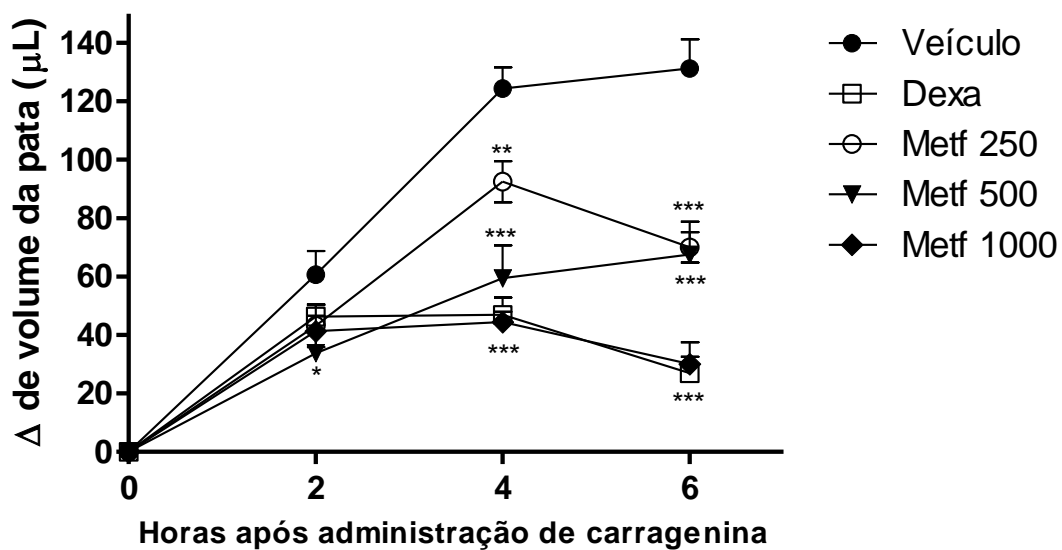


Figura 31 - Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, -1 h) ou pela dexametasona (Dexa; 10 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n=8$.

A



B

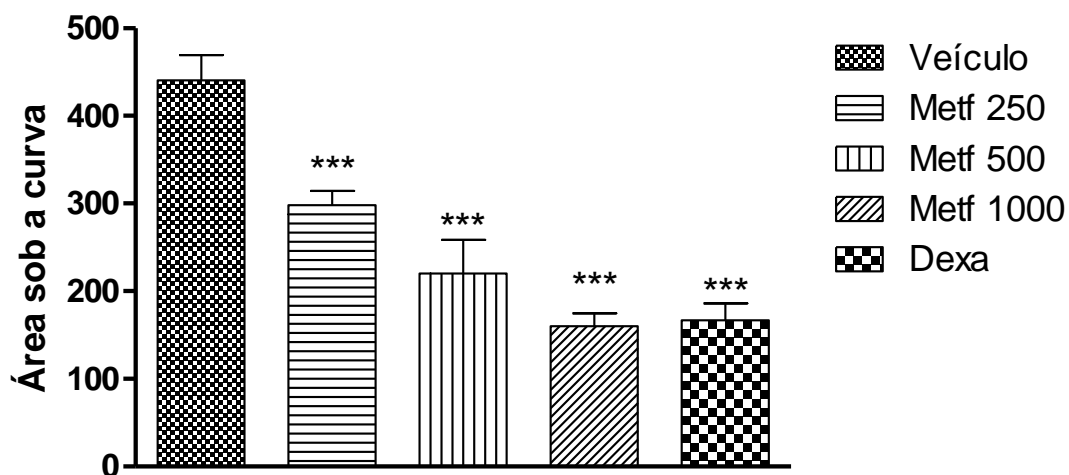


Figura 32 - Efeito induzido pela metformina (Metf; 250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, 1 h) ou pela dexametasona (Dexa; 10 mg/kg, *p.o.*, 1 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n=7$.

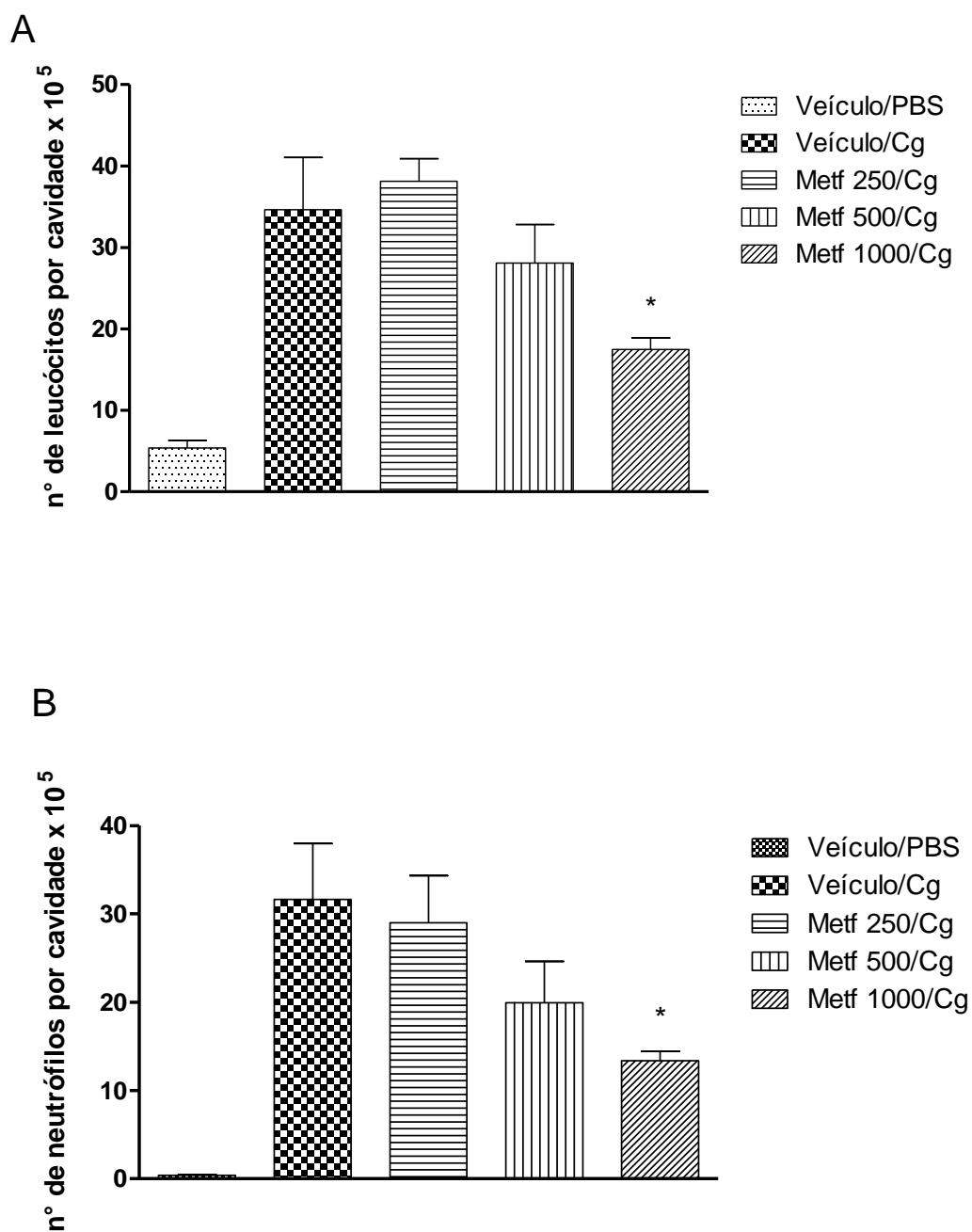


Figura 33 – Efeito induzido pela metformina (250, 500 ou 1000 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre a migração de leucócitos totais (A) ou neutrófilos (B) induzida por carragenina. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). $n = 6$.

5.8 Efeitos induzidos pela naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva da metformina

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela naltrexona sobre a atividade antinociceptiva da metformina no modelo de placa quente, a latência do grupo controle foi de aproximadamente 12 s. A metformina, na dose de 1000 mg/kg, inibiu a resposta nociceptiva, aumentando a latência para, aproximadamente, 22 s. A naltrexona, administrada isoladamente na dose de 10 mg/kg, não induziu alteração estatisticamente significativa da latência. A latência média desse grupo foi de, aproximadamente, 16 s, não diferindo estatisticamente daquela do grupo controle. No entanto, quando administrada previamente à metformina, a naltrexona, na dose de 10 mg/kg, atenuou o efeito antinociceptivo induzido por esse fármaco, reduzindo a latência para, aproximadamente, 18 s (**Figura 34**).

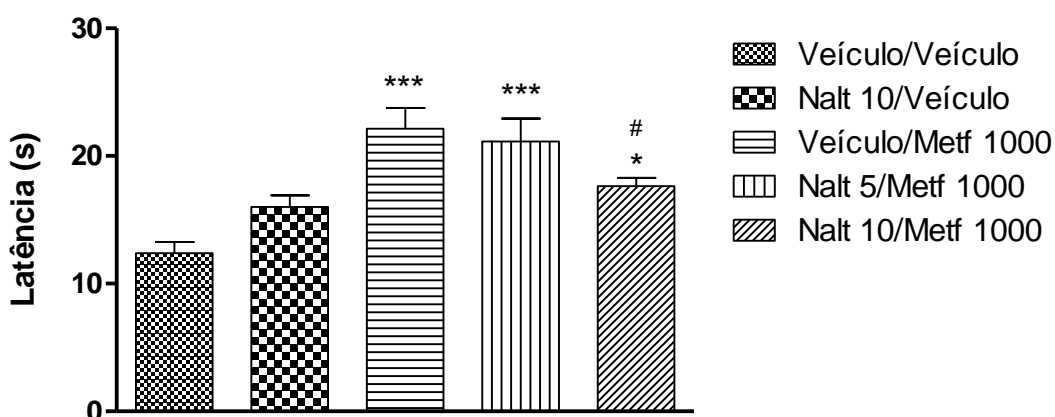


Figura 34 – Efeito induzido pela naltrexona (Nalt; 5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da metformina (Metf; 1000 mg/kg, p.o.) em modelo de placa quente. A naltrexona foi administrada 15 min antes da metformina e essa foi administrada 1 h antes da avaliação na placa. * e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com metformina ($p < 0,05$). $n=7$.

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela ciproheptadina sobre a atividade antinociceptiva da metformina em modelo de placa quente, a latência do grupo controle foi de, aproximadamente, 14 s. A metformina, na dose de 1000 mg/kg, inibiu a resposta nociceptiva, aumentando a latência para, aproximadamente, 25 s. A ciproheptadina, administrada isoladamente na dose

de 10 mg/kg, não alterou a latência. A latência média desse grupo foi de, aproximadamente, 13 s, não diferindo estatisticamente daquela do grupo controle. No entanto, quando administrada previamente à metformina, a ciproheptadina, na dose de 5 mg/kg, atenuou o efeito antinociceptivo induzido por esse fármaco, reduzindo a latência para, aproximadamente, 19 s. A dose de 10 mg/kg reverteu o efeito antinociceptivo induzido pela metformina, reduzindo a latência para, aproximadamente, 14 s (**Figura 35**).

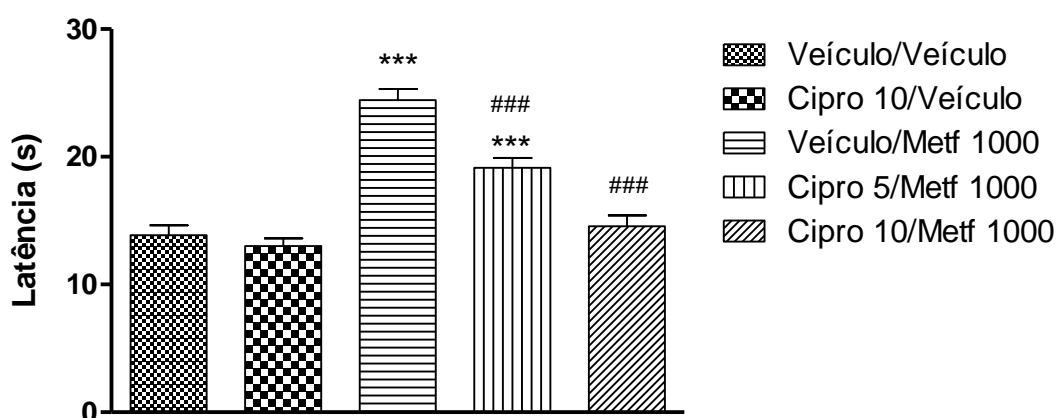


Figura 35 – Efeito induzido pela ciproheptadina (Cipro; 5 ou 10 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antinociceptiva da metformina (Metf; 1000 mg/kg, *p.o.*) em modelo de placa quente. A ciproheptadina foi administrada 30 min antes da metformina e essa foi administrada 1 h antes da avaliação na placa. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). ### indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com metformina ($p < 0,001$). $n=7$.

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva da metformina em modelo de placa quente, a latência do grupo controle foi de, aproximadamente, 14 s. A metformina, na dose de 1000 mg/kg, inibiu a resposta nociceptiva, aumentando a latência para, aproximadamente, 25 s. A glibenclamida, administrada isoladamente na dose de 40 mg/kg, não induziu efeito sobre a latência. A latência média desse grupo foi de, aproximadamente, 16 s, não diferindo estatisticamente daquela do grupo controle. O tratamento prévio com glibenclamida, nas doses de 20 mg/kg ou 40 mg/kg, não alterou a atividade antinociceptiva da metformina (**Figura 36**).

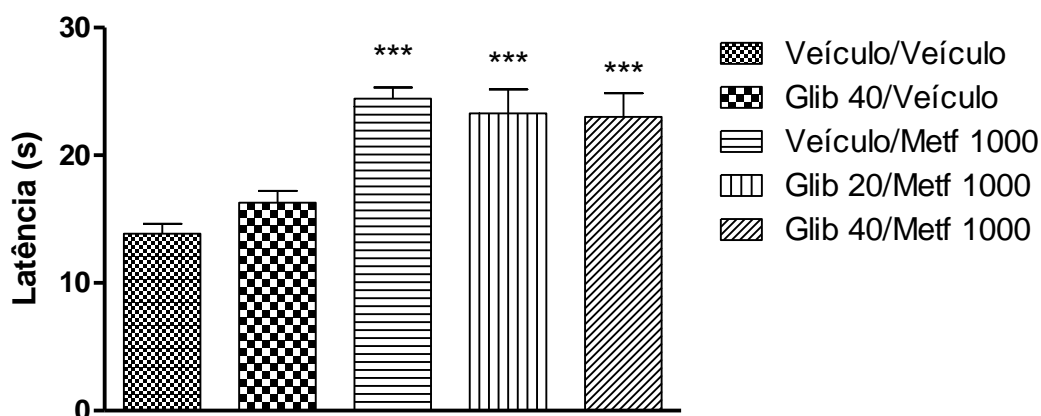


Figura 36 – Efeito induzido pela glibenclamida (Glib; 20 ou 40 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antinociceptiva da metformina (Metf; 1000 mg/kg, *p.o.*) em modelo de placa quente. A glibenclamida foi administrada 30 min antes da metformina e essa foi administrada 1 h antes da avaliação na placa. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n=7$.

5.9 Efeitos induzidos pela naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade antialodínica da metformina

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela naltrexona sobre a atividade antialodínica da metformina, os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo controle foram de aproximadamente 2,5, 2,0 e 3,0 g na 2^a, na 4^a e na 6^a h após a administração de carragenina, respectivamente. O tratamento com metformina na dose de 1000 mg/kg reduziu a alodínia mecânica na 2^a e na 4^a h. Os valores médios do limiar nociceptivo foram de 3,8 e 3,2 g, respectivamente. A naltrexona, administrada isoladamente na dose de 10 mg/kg, não inibiu a alodínia mecânica. Os valores médios do limiar nociceptivo para esse grupo não diferiram estatisticamente dos valores do grupo controle (2,5, 1,7 e 1,9 g na 2^a, na 4^a e na 6^a h, respectivamente). A naltrexona, nas doses de 5 e 10 mg/kg, não atenuou a atividade antialodínica da metformina (**Figura 37**).

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela glibenclamida sobre a atividade antialodínica da metformina, os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo controle foram de aproximadamente 2,5 g nos três momentos de avaliação. O tratamento com metformina reduziu a alodínia mecânica. Os

valores médios do limiar nociceptivo para o grupo que recebeu o tratamento com metformina foram de 4,8 e 3,6 g, na 2^a e na 4^a h, respectivamente. A glibenclamida, administrada isoladamente na dose de 40 mg/kg, não inibiu a indução de alodínia mecânica. Os valores médios do limiar nociceptivo para esse grupo não diferiram estatisticamente dos valores do grupo controle (2,6 , 2,0 e 2,3 g na 2^a, na 4^a e na 6^a h, respectivamente (**Figura 38**). A glibenclamida na dose de 40 mg/kg, atenuou o efeito antinociceptivo induzido pela metformina após a administração de carragenina. Esse efeito foi observado apenas na 2^a h, quando o limiar nociceptivo observado para esse grupo diferiu estatisticamente do grupo tratado com metformina (3,2 e 4,8 g, respectivamente). Uma avaliação global indicou redução significativa do limiar nociceptivo no grupo tratado com glibenclamida na dose de 40 mg/kg (**Figura 38B**).

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela ciproheptadina sobre a atividade antialodínica da metformina, os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo controle foram de 1,7, 2,0 e 1,9 g na 2^a, na 4^a e na 6^a h, respectivamente. O tratamento com metformina reduziu a alodínia mecânica. O valor médio do limiar nociceptivo na 2^a h foi de 4,1 g. Apesar do curso temporal não indicar diferença estatística na 4^a e 6^a h para o grupo tratado com metformina em relação ao grupo controle, uma avaliação global indicou que a metformina inibiu significativamente a alodínia mecânica. A ciproheptadina, administrada isoladamente na dose de 10 mg/kg, não inibiu a alodínia mecânica. Os valores médios do limiar nociceptivo para esse grupo não diferiram estatisticamente dos valores do grupo controle (2,4, 2,2 e 2,9 g na 2^a, na 4^a e na 6^a h, respectivamente). A ciproheptadina, nas doses de 5 e 10 mg/kg, não alterou a atividade antinociceptiva da metformina (**Figura 39**).

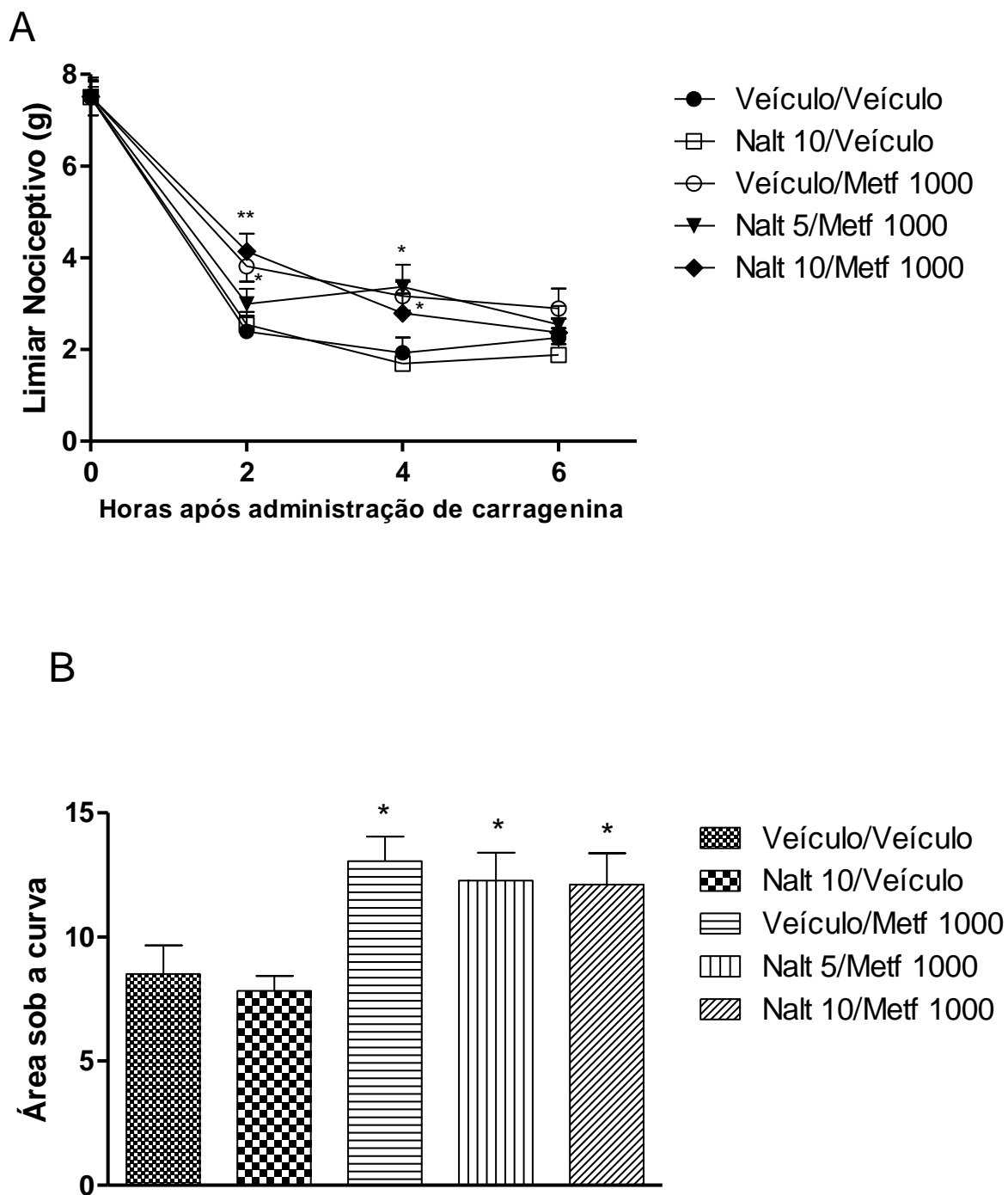


Figura 37 – Efeito induzido pela naltrexona (Nalt; 5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antialodínica da metformina (Metf; 1000 mg/kg, p.o.). A naltrexona foi administrada 15 min antes da metformina e essa foi administrada 1 h antes da carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n=7$.

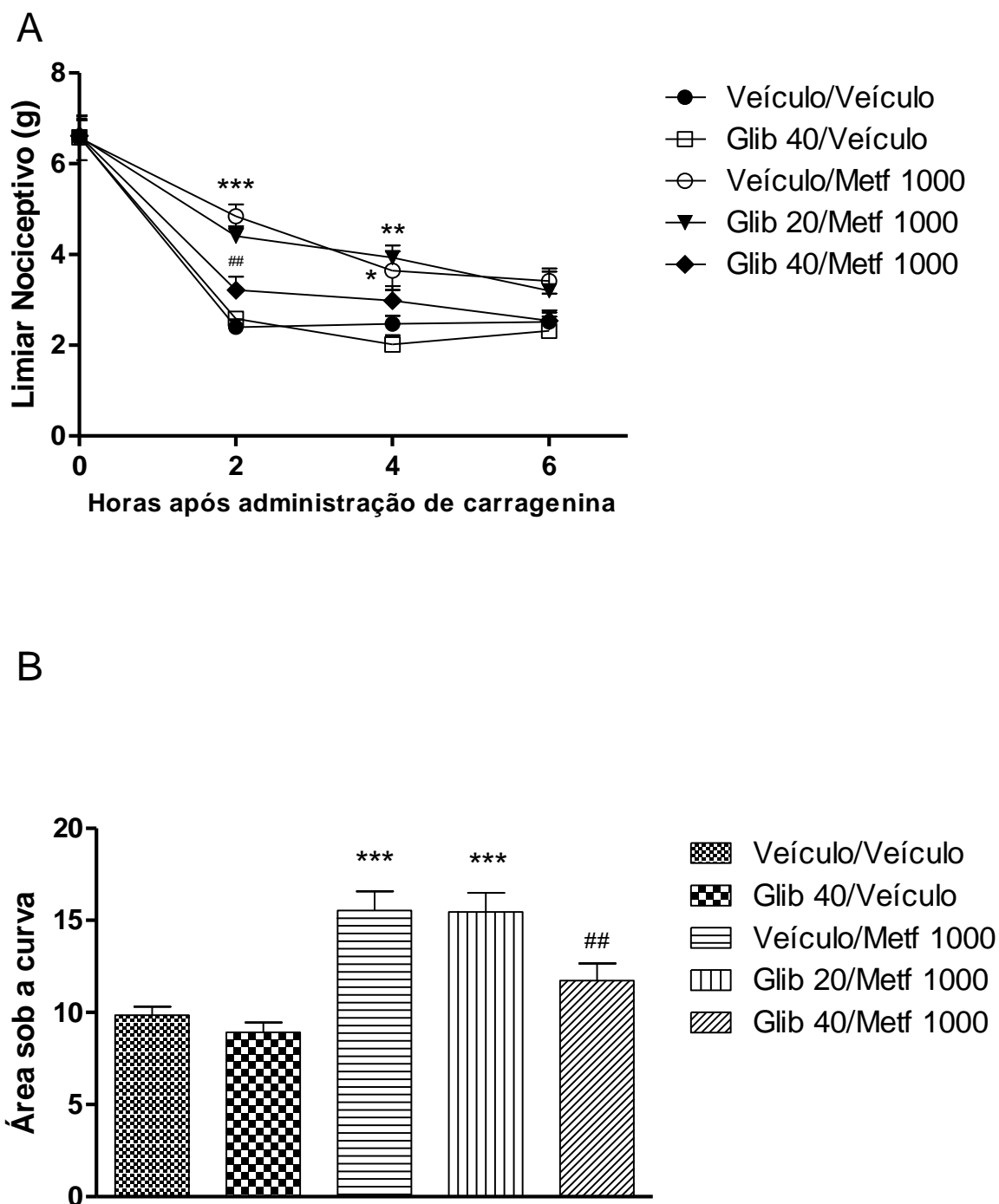


Figura 38 – Efeito induzido pela glibenclamida (Glib; 20 ou 40 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antialodínica da metformina (Metf; 1000 mg/kg, *p.o.*). A glibenclamida foi administrada 30 min antes da metformina e essa foi administrada 1 h antes da carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). ## indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com metformina ($p < 0,01$). $n = 7$.

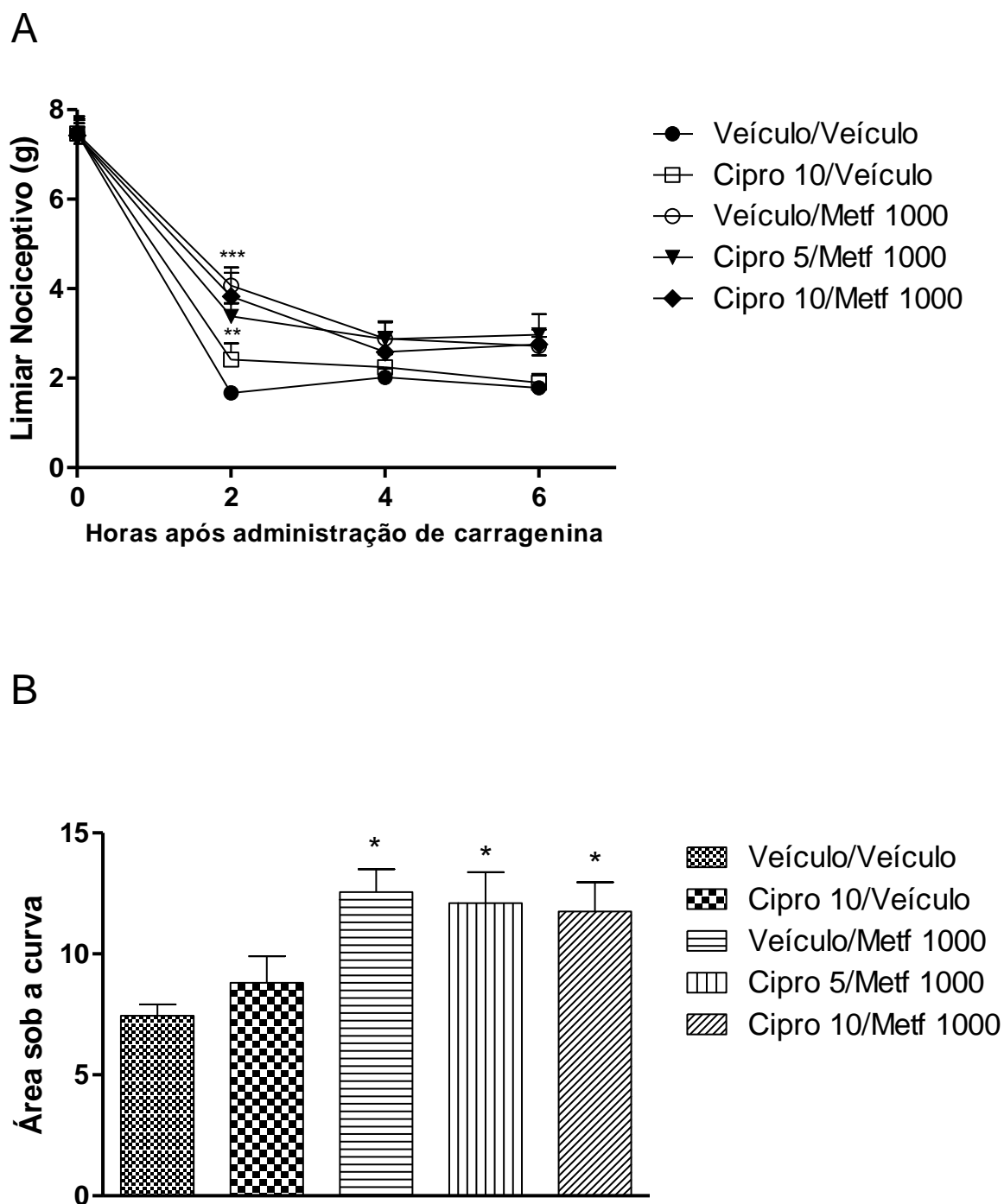


Figura 39 – Efeito induzido pela ciproheptadina (Cipro; 5 ou 10 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antialodínica da metformina (Metf; 1000 mg/kg, *p.o.*). A ciproheptadina foi administrada 30 min antes da metformina e essa foi administrada 1 h antes da carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 7$

6 DISCUSSÃO

A busca de novas terapias para pacientes acometidos por inflamações ou dores agudas e crônicas é um desafio para a farmacologia moderna, haja vista o grande número de doenças que provocam essas condições ou se originam das mesmas e os perfis inadequados de eficácia e segurança de muitos fármacos atualmente em uso.

A metformina é um fármaco tradicionalmente utilizado no tratamento de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e apresenta atividade anti-inflamatória evidenciada em alguns ensaios pré-clínicos. Embora a atividade hipoglicemiante da metformina seja associada, principalmente, à ativação da AMPK, pouco se sabe sobre a ação dessa enzima nos processos inflamatório e nociceptivo ou, ainda, se há outros mecanismos envolvidos nas atividades desse fármaco.

Neste estudo, foram avaliadas as atividades da metformina em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação. Esse fármaco apresentou atividade em modelos de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática e também em modelos de inflamação como pleurisia e edema de pata, caracterizando ações tanto na nocicepção quanto na inflamação. Os mecanismos que medeiam a ação da metformina nesses modelos parecem envolver a participação de receptores opiodérgicos, serotoninérgicos e ativação de canais para potássio ATP-dependentes.

6.1 Atividade da metformina em modelos de dor

A exposição dos animais à placa quente é um dos métodos mais antigos e amplamente utilizados para avaliação da nocicepção em ratos e camundongos (GUNN *et al.*, 2011). Nesse modelo, o estímulo térmico provoca um comportamento nociceptivo nos camundongos pela ativação direta dos nociceptores (Le BARS *et al.*, 2001). À temperatura de 50 °C, utilizada no experimento, ocorre ativação de receptores da família TRP, importantes para o

processamento inicial da resposta nociceptiva a estímulos nocivos, tais como o calor (TOMINAGA *et al.*, 1998).

Alguns fármacos com atividade sobre o SNC - tais como opioides e antidepressivos tricíclicos - são capazes de aumentar a latência para o comportamento nociceptivo (LOH *et al.*, 1976; MESDJIAN *et al.*, 1983; ROSLAND *et al.*, 1988), enquanto fármacos com ação predominantemente anti-inflamatória não induzem alterações desse parâmetro (LAVICH *et al.*, 2005). Uma série de fatores pode influenciar a resposta nociceptiva nesse modelo, tais como intensidade do estímulo, sensibilidade, massa e gênero dos animais e tempo de ambientação (GUNN *et al.*, 2011).

A metformina elevou de forma marcante a latência para o comportamento nociceptivo no modelo de placa quente, sendo a sua eficácia semelhante àquela da dipirona. Embora a atividade da metformina já tenha sido demonstrada em outros modelos de dor, o presente estudo representa a primeira demonstração da atividade da metformina em um modelo de dor nociceptiva. A atividade da metformina nesse modelo experimental sugere ações no processamento nociceptivo no SNC ou nos mecanismos de ativação direta dos nociceptores sensíveis a estímulos térmicos.

A atividade da metformina também foi demonstrada em um modelo de dor inflamatória induzida por carragenina. A carragenina é uma mistura de polissacarídeos extraída de algas marinhas da família *Rhodophyceae* e composta, principalmente, por D-galactose sulfatada. Os modelos de alodínia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina têm sido frequentemente utilizados na investigação das atividades analgésica e anti-inflamatória de fármacos ou candidatos a fármacos desde a demonstração de que a injeção i.pl. dessa mistura de polissacarídeos em ratos levava ao desenvolvimento de um processo inflamatório local (CRUNKHORN & MEACOCK, 1971; DiROSA, 1972).

A injeção i.pl. de carragenina induz uma resposta inflamatória aguda com liberação de diversos mediadores inflamatórios que levam à formação de edema e ao desenvolvimento de alodínia mecânica (POSADAS *et al.*, 2004).

No presente estudo, a alodínia mecânica induzida pela injeção i.pl. de carragenina foi inibida pela metformina. A atividade da metformina em outro modelo de dor inflamatória também foi demonstrada por Russe *et al.* (2013). Nesse estudo, os autores demonstraram que a metformina inibe a hiperalgesia induzida pela injeção i.pl. de zimosano, um polissacarídeo obtido de fungos e tradicionalmente usado em modelos de inflamação (MELLER & GEBHART, 1997).

Tendo em vista os resultados anteriores indicando a atividade da metformina em modelos de dor nociceptiva e de dor inflamatória, a atividade desse fármaco foi avaliada em outro modelo experimental de dor que agrega aspectos tanto da dor nociceptiva quanto da dor inflamatória. A resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos constitui-se de duas fases. A primeira fase, que apresenta características de um modelo de dor nociceptiva, ocorre entre 0 e 5 min após a administração do estímulo e envolve a ativação direta de nociceptores, principalmente fibras C. A segunda fase, que apresenta características de um modelo de dor inflamatória, ocorre entre 15 e 30 min após a administração do formaldeído e está associada à produção de vários mediadores inflamatórios (TJØLSEN *et al.*, 1992). Fármacos analgésicos com ação predominantemente central, como os opioides, bem como alguns AINEs em doses mais elevadas, como o ácido acetilsalicílico, tem ação sobre ambas as fases, enquanto fármacos com ação predominantemente anti-inflamatória, como a maioria dos AINEs, geralmente inibem apenas a segunda fase (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992).

A metformina atenuou a primeira fase da resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído. Embora essa atividade ainda não tivesse sido relatada em estudos anteriores, esse resultado era esperado, uma vez que, no presente estudo, fora demonstrada a atividade da metformina no modelo de placa

quente, sugerindo sua ação no processamento nociceptivo no SNC ou nos mecanismos de ativação direta dos nociceptores por estímulos químicos.

A segunda fase da resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído foi totalmente inibida pela metformina. Outros autores também descreveram a atividade da metformina na segunda fase desse teste (MONTES *et al.*, 2012; RUSSE *et al.*, 2013). Embora drogas ou fármacos que inibem o processamento nociceptivo no SNC possam inibir ambas as fases da resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído, a inibição marcante da segunda fase dessa resposta indica que a atividade da metformina também pode estar associada à inibição da produção e/ou ação de mediadores inflamatórios que têm papel relevante nesse processo. Esse resultado vai ao encontro daquele observado no modelo de dor inflamatória induzida por carragenina, no qual a metformina também apresentou atividade.

No presente estudo, também foi demonstrada a atividade da metformina em um modelo de dor neuropática. A metformina inibiu a alodínia mecânica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático. Outros autores demonstraram a atividade da metformina em modelos de dor neuropática. Mao-Ying *et al.* (2014) demonstraram que a metformina atenua a alodínia e a hiperalgesia em um modelo de neuropatia diabética, enquanto Melemedjian *et al.* (2011) demonstraram que esse fármaco atenua a alodínia mecânica induzida pela constrição de nervo bem como as alterações bioquímicas associadas à sensibilização. A atividade da metformina em modelos de dor neuropática representa um resultado de grande interesse quando se vislumbra o reposicionamento desse fármaco, uma vez que há poucas alternativas farmacoterapêuticas úteis para o alívio dessa categoria de dor.

Uma vez que a metformina não alterou o tempo de permanência dos camundongos na haste girante, é muito pouco provável que a atenuação do comportamento nociceptivo induzida por esse fármaco nos modelos anteriormente indicados seja resultado de comprometimento da atividade motora ou de relaxamento muscular. Essa observação é importante para

validar os resultados encontrados e indica que a redução do comportamento nociceptivo nos diferentes modelos experimentais resulta de uma atividade antinociceptiva genuína da metformina.

A atividade da metformina em modelos de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática indica que esse fármaco pode afetar tanto o processamento periférico quanto central da resposta nociceptiva. A inibição da resposta nociceptiva induzida por calor e da primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído permite sugerir que a metformina pode inibir o processamento nociceptivo no SNC ou os mecanismos de ativação direta dos nociceptores por estímulos químicos.

Por outro lado, a inibição marcante da segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído, bem como da alodínia mecânica induzida por carragenina ou por constrição de nervo, indica que a metformina pode inibir a produção e/ou ação de mediadores inflamatórios importantes para essas respostas. Há demonstração de que a metformina inibe a produção de vários mediadores inflamatórios *in vivo* (KATO, 2010; PARK *et al.*, 2012; YUAN *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2015; CAHOVA *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015), o que pode contribuir para explicar a atividade do fármaco nos modelos anteriormente indicados. No presente estudo, foi demonstrado que a metformina também inibe a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse efeito também pode contribuir para a atividade da metformina em modelos de dor inflamatória e neuropática, uma vez que essas células produzem mediadores que tem papel relevante na gênese da sensibilização dos nociceptores induzida pela inflamação ou por lesões de nervos (COLLINS, 1999; SCHOLZ & WOOLF, 2002).

Tendo em vista que a metformina é um ativador da AMPK, é possível que a ativação dessa enzima contribua para a atividade antinociceptiva observada nos diferentes modelos experimentais. Embora no presente estudo não tenha sido realizada uma investigação direta do papel da AMPK nas atividades da metformina, há vários estudos indicando que essa enzima desempenha papel

relevante no processamento nociceptivo e que a sua ativação pode mediar a atividade de diferentes drogas em modelos de dor e inflamação.

Russe et al. (2013) demonstraram que a metformina inibe a hiperalgesia induzida por zimosano via ativação de AMPK, uma vez que a atividade do fármaco não foi observada em animais deficientes para essa enzima. Estudos demonstram que o resveratrol, um ativador da AMPK, reverte a hiperalgesia induzida por carragenina (PHAM-MARCOU *et al.*, 2008) e zimosano (GENTILLI *et al.*, 2001) em ratos. Por sua vez, Gui et al. (2015) demonstraram que a ativação da AMPK está relacionada a atividade antialodínica da troxerrutina em modelo de constrição de nervo em camundongos. Também há evidências de que a metformina e outros ativadores de AMPK inibem a resposta nociceptiva em modelos de dor inflamatória induzida por incisão (TILLU *et al.*, 2012, PRICE & DUSSOR; 2014; PRICE *et al.*, 2015).

A AMPK também é capaz de regular vários processos celulares, incluindo aqueles relacionados ao surgimento da dor neuropática. Sabe-se que a neuroinflamação e disfunções nos transportadores de glutamato no corno dorsal da medula estão relacionados à gênese da dor neuropática. Várias intervenções farmacológicas indicam que ativadores da AMPK apresentam atividade em modelos de dor neuropática. Song et al. (2015) demonstraram que o resveratrol atenua a alodínia mecânica e a neuroinflamação induzidas por tumor ósseo em ratos. Esses autores demonstraram também que um inibidor da AMPK reverte a atividade do resveratrol, evidenciando o envolvimento dessa enzima na antinocicepção induzida por esse polifenol. Outros estudos recentes demonstraram que a metformina e outros ativadores da AMPK atenuam a sensibilização em modelos de lesão do nervo isquiático, neuropatia periférica induzida por quimioterapia e neuropatia diabética (MELEMEDJIAN *et al.*, 2011, TILLU *et al.*, 2012, PRICE & DUSSOR; 2014; PRICE *et al.*, 2015).

Investigações moleculares também tem proporcionado resultados que indicam o papel da AMPK na gênese da dor neuropática. Em estudo conduzido por

Maixner et al. (2015), foi demonstrado que a atividade da AMPK está reduzida no corno dorsal da medula de ratos com hiperalgesia térmica induzida por lesão no nervo. Essa diminuição da atividade foi acompanhada por ativação de astrócitos, aumento da produção de IL-1 β e ativação da glicogênio sintase cinase 3, além de supressão da expressão do transportador de glutamato 1, processos moleculares que participam da gênese da dor neuropática (DANBOLT, 2001; SUNG *et al.*, 2003; NIE & WENG, 2010; YAN *et al.*, 2014). Em animais deficientes para AMPK ocorre exacerbação da alodínia mecânica induzida por zimosano (RUSSE *et al.*, 2013). Também há evidências de que a redução da atividade da AMPK possa contribuir para a alodínia mecânica em um modelo de dor neuropática induzido por diabetes experimental (MA *et al.*, 2015).

Embora exista demonstração inequívoca da ativação da AMPK pela metformina e também que essa enzima desempenha papel importante no processamento nociceptivo, é provável que a atividade desse fármaco em modelos de dor não resulte exclusivamente da ativação dessa enzima. Em estudo conduzido por Russe et al. (2013), foi observado que animais deficientes para AMPK apresentaram latência para resposta nociceptiva no modelo de placa quente semelhante àquela dos animais selvagens. Esse resultado vai de encontro àquele observado no presente estudo, no qual foi demonstrado que a metformina aumentou a latência para a resposta nociceptiva nesse modelo experimental, indicando que outros mecanismos que não ativação da AMPK possam estar envolvidos.

Outra via que pode ser relevante para a atividade antinociceptiva da metformina envolve os receptores imidazolínicos. Esses receptores formam uma família (I1, I2 e I3) e reconhecem compostos de estrutura imidazolínica (LI & ZHANG, 2011). Sabe-se que esses receptores, especialmente os do tipo I2, estão envolvidos na modulação do processamento nociceptivo e que agonistas desses receptores apresentam atividade em modelos de dor inflamatória induzida por CFA e dor neuropática induzida por constrição de nervo em camundongos (HEAD & MAYROV, 2006; LI & ZHANG, 2011; LI *et al.*, 2014).

Uma vez que há evidências de que compostos contendo o grupo guanidina, tais como a metformina, são capazes de atuar como agonistas de receptores do tipo I2 (LEE *et al.*, 2011), pode-se sugerir que a interação com esses receptores seja um mecanismo importante para a atividade antinociceptiva da metformina e moléculas estruturalmente relacionadas.

6.2 Atividade da metformina em modelos de inflamação

A atividade da metformina também foi avaliada em dois modelos de inflamação, o edema de pata e a pleurisia induzidos por carragenina. O edema de pata e a pleurisia induzidos, respectivamente, pela injeção intraplantar e intrapleural de carragenina são modelos amplamente usados para a investigação de candidatos a fármacos anti-inflamatórios. O edema induzido por carragenina, avaliado principalmente pelo aumento do volume da pata injetada, é resultado da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, que culminam com extravasamento de líquido para o interstício. Por sua vez, a pleurisia induzida por carragenina é avaliada pelo acúmulo de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, na pleura. A resposta inflamatória induzida por carragenina nos dois modelos é resultado da ação de vários mediadores de diferentes naturezas (FRÖDE *et al.*, 2001; FRÖDE *et al.*, 2002; MORRIS, 2003).

Em concordância com o resultado obtido no modelo de dor inflamatória induzida por carragenina, a metformina também inibiu o edema de pata e o acúmulo de células inflamatórias na pleura induzidos por esse estímulo. No modelo de edema de pata, assim como no modelo de alodínia mecânica, a metformina apresentou atividade quando administrada previamente ou posteriormente à carragenina. É importante ressaltar que nesse modelo, a eficácia da metformina foi semelhante à da dexametasona, mesmo quando administrada após o estímulo inflamatório. Resultado semelhante foi obtido por Russe *et al.* (2013) ao demonstrarem que a metformina inibe o edema de pata induzido por zimosano em ratos. Chen *et al.* (2015) também demonstraram que

a metformina atenua o acúmulo de macrófagos e neutrófilos nos pulmões em um modelo de displasia broncopulmonar em ratos neonatos.

A inibição do edema de pata e da pleurisia induzidos por carragenina em animais tratados com metformina pode estar associada ao efeito inibitório induzido por esse fármaco sobre a produção de vários mediadores inflamatórios. Metformina inibe a produção de TNF- α e IL-6 (PARK *et al.*, 2012; YUAN *et al.*, 2012; CAHOVA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015), IL-1 β (CAHOVA *et al.*, 2015), IL-17 (LEE *et al.*, 2015) e NO (KATO, 2010), mediadores que têm papel importante na indução do edema (COLLINS, 1999; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004) e da pleurisia (FRÖDE *et al.*, 2001; FRÖDE *et al.*, 2002; LUCHESE *et al.*, 2012; ALLEGRA *et al.*, 2014).

Considerando-se que a metformina é um ativador da AMPK, poderia ser sugerido que a ativação dessa enzima contribui para a atividade do fármaco nos dois modelos avaliados. Entretanto, o papel da AMPK no controle das respostas avaliadas é controverso. Russe *et al.* (2013) demonstraram que o efeito inibitório induzido pela metformina sobre o edema de pata induzido por zimosano não é observado em animais deficientes para AMPK, indicando que a ativação dessa enzima inibe o processo inflamatório e medeia a atividade do fármaco. Por outro lado, em modelos de inflamação nos quais a quimiotaxia foi avaliada, há evidências de que ativadores da AMPK aumentam (PARK *et al.*, 2013) ou reduzem (RAMESHRAD *et al.*, 2016) o acúmulo de leucócitos em sítios inflamatórios. Os resultados do presente estudo, bem como aqueles de outros estudos, indicam que a metformina inibe várias manifestações da resposta inflamatória por meio de mecanismos que não necessariamente estão associados à ativação da AMPK.

6.3 Avaliação do papel da ativação de vias opioidérgicas, serotoninérgicas e de canais para potássio ATP-dependentes na atividade antinociceptiva da metformina

Vários estudos indicam que a ativação de vias opioidérgicas (YAKSH & WALLACE, 2012), serotoninérgicas (YAKSH, 1978; JÜRGENSEN *et al.*, 2005; MICOV *et al.*, 2010) e de canais para potássio ATP-dependentes (ALVES & DUARTE, 2002; ALVES *et al.*, 2004; LEÓN-REYES *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2010) contribuem para a atividade de várias drogas ou fármacos em diferentes modelos experimentais de dor. Entretanto, não há estudos que tenham investigado o papel dessas vias na atividade antinociceptiva da metformina.

Visando investigar o papel de receptores opioidérgicos, serotoninérgicos e de canais para potássio ATP-dependentes na atividade da metformina em um modelo de dor nociceptiva e em um modelo de dor inflamatória, foram utilizadas três ferramentas farmacológicas: naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida. A naltrexona é um antagonista não seletivo de receptores opioides (YAKSH & WALLACE, 2012), enquanto a ciproheptadina é um antagonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1/2} que também possui ação anti-histamínica (STONE *et al.*, 1961). A glibenclamida é um hipoglicemiante da classe das sulfonilureias cujo principal mecanismo de ação é a inibição da abertura de canais para potássio ATP-dependentes (LUZI & POZZA, 1997). Esses fármacos representam importantes ferramentas para a investigação de possíveis mecanismos de ação de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.

O envolvimento de vias opioidérgicas, serotoninérgicas e de canais para potássio ATP-dependentes nas atividades da metformina variou em função do modelo experimental de dor.

A naltrexona atenuou parcialmente a atividade antinociceptiva da metformina em um modelo de dor nociceptiva, mas não em um modelo de dor inflamatória. A atenuação da atividade da metformina em animais previamente tratados com

naltrexona indica que esse fármaco poderia interagir com receptores opioides ou estimular a liberação de peptídeos opioides endógenos, o que poderia contribuir para a atividade antinociceptiva em alguns modelos experimentais. Embora não exista demonstração da interação da metformina com receptores opioides, há estudos demonstrando que esse fármaco induz aumento da concentração plasmática de β -endorfina, um peptídeo opioide que interage preferencialmente com receptores μ e δ (GHELARDINI *et al.*, 2015), em humanos (CHENG *et al.*, 2006) e em ratos (LEE *et al.*, 2011).

A serotonina é uma amina biogênica que possui um papel complexo no processamento da resposta nociceptiva contribuindo tanto para a sensibilização de nociceptores no SNP quanto para a inibição da nocicepção no SNC (MILLAN, 2002; VIGUIER *et al.*, 2013). A ciproheptadina, quando administrada previamente à metformina, inibiu completamente sua atividade no modelo de dor nociceptiva, mas não no modelo de dor inflamatória. A inibição da atividade da metformina em animais previamente tratados com ciproheptadina indica que esse fármaco poderia interagir com receptores serotoninérgicos ou facilitar a neurotransmissão serotoninérgica, o que poderia contribuir para a atividade antinociceptiva em alguns modelos experimentais. Embora não exista demonstração da interação da metformina com receptores serotoninérgicos, há estudo demonstrando que esse fármaco inibe de forma concentração-dependente a recaptação de serotonina em células que expressam os transportadores OCT1, OCT3 e SERT (YEE *et al.*, 2015).

Sabe-se que a atividade antinociceptiva de diversos fármacos e drogas, entre os quais o diclofenaco e a dipirona (ALVES & DUARTE, 2002; ALVES *et al.*, 2004) e agonistas de receptores opioides (YANG *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2005; KHANNA *et al.*, 2011), é atenuada por bloqueadores de canais para potássio ATP-dependentes. Embora não tenha alterado a atividade da metformina no modelo de dor nociceptiva, a glibenclamida aboliu a atividade da metformina no modelo de dor inflamatória. Esse resultado sugere que a ativação de canais para potássio ATP-dependentes representa um evento importante mediando a atividade antinociceptiva da metformina no modelo de

dor inflamatória. Uma vez que metformina é um ativador da AMPK, o envolvimento de canais para potássio ATP-dependentes na sua atividade antinociceptiva pode representar um evento esperado, tendo em vista resultados de outros estudos. Há evidências da interação entre AMPK e canais para potássio ATP-dependentes. Vários estudos *in vitro* indicam que a AMPK regula de forma positiva a função desses canais em vários tecidos e órgãos, incluindo pâncreas, miocárdio e cérebro (IKEMATSU *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2014). Estudo *in vivo* conduzido por Gaskin *et al.* (2009) forneceu suporte a essa interação, ao demonstrar que inibidores de canais para potássio ATP-dependentes atenuam a atividade de um ativador de AMPK em modelo de lesão resultante de isquemia seguida de reperfusão.

Tendo em vista os modelos avaliados no presente estudo, sugere-se que a atividade da metformina em modelo de dor nociceptiva, mas não de dor inflamatória, envolve a ativação de vias opioidérgicas e serotoninérgicas. Por sua vez, em modelo de dor inflamatória, sugere-se que a ativação de canais para potássio ATP-dependentes representa um evento mais relevante que a ativação de vias opioidérgicas e serotoninérgicas. O envolvimento de diferentes mecanismos na atividade da mesma droga ou fármaco em diferentes modelos experimentais pode estar associado a diferenças dos processamentos nociceptivos. Outros estudos fornecem suporte a essa sugestão ao demonstrar que antagonistas diversos, incluindo opioides seletivos, opioides não seletivos e histaminérgicos, afetam de forma diferente os efeitos induzidos pela mesma droga em diferentes modelos experimentais de dor (GOODCHILD *et al.*, 1997; THONGPRADICHOTE *et al.*, 1998; GIRARD *et al.*, 2004).

6.4 Limitações

Os resultados do presente estudo são promissores quando se tem em perspectiva o reposicionamento da metformina como um fármaco analgésico e anti-inflamatório. Porém, sabe-se que a translação de resultados de ensaios pré-clínicos para ensaios clínicos é limitada, principalmente quando se trata de

candidatos a fármacos com atividade analgésica. Há um número muito elevado de moléculas que apresentam atividade antinociceptiva em ensaios pré-clínicos, um resultado que contrasta com o reduzido número de fármacos analgésicos aprovados nas últimas décadas (KISSIN *et al.*, 2010; PERCIE DU SERT & RICE, 2014). Dessa forma, embora os resultados sejam promissores, não se pode afirmar que os resultados positivos obtidos em ensaios pré-clínicos venham a ser reproduzidos em ensaios clínicos.

Também devem ser ressaltadas as limitações inerentes aos próprios modelos experimentais utilizados, nos quais os parâmetros nociceptivos utilizados se baseiam principalmente em respostas de esquiva, ou seja, uma avaliação de aspectos que se relacionam mais à dimensão sensorial e menos à dimensão afetiva da dor (MOGIL & CRAGER, 2004; ZHANG *et al.*, 2011; MATSUMIYA *et al.*, 2012).

Outro ponto a ser considerado remete ao possível reposicionamento desse fármaco para o tratamento de pacientes com dor crônica. Embora a metformina seja um fármaco com um perfil de segurança bastante favorável, pouco se sabe sobre os efeitos induzidos pelo seu uso prolongado por pacientes não diabéticos. Embora a metformina seja prescrita para pacientes não diabéticos, como mulheres com síndrome do ovário policístico, deve ser ressaltado que essas pacientes apresentam resistência à insulina e o tratamento ocorre por períodos curtos (LORD *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006).

6.5 Perspectivas

A metformina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento de pacientes com diabetes mellitus tipo 2, apresentando um perfil de segurança bem caracterizado. Os resultados do presente estudo fornecem suporte à proposta de reposicionamento da metformina como um fármaco analgésico e anti-inflamatório. Alguns aspectos associados às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da metformina e identificados no presente estudo são relevantes quando se tem em perspectiva o reposicionamento desse fármaco. A

demonstração da atividade da metformina mesmo quando a inflamação e a sensibilização das vias nociceptivas estão estabelecidas representa um resultado expressivo do ponto de vista clínico, considerando que os pacientes acometidos de condições inflamatórias e dolorosas tradicionalmente usam medicamentos contendo fármacos anti-inflamatórios ou analgésicos quando já houve produção marcante de mediadores que causam mudanças fenotípicas de nociceptores e alterações vasculares extensas. Outro aspecto relevante, considerando que a maioria dos fármacos analgésicos atualmente disponíveis apresenta eficácia reduzida em pacientes com dor neuropática, foi a demonstração da atividade da metformina em um modelo de alodínia mecânica induzida pela constrição de nervo. Em modelos de dor e edema inflamatórios, a metformina apresentou eficácia igual ou superior àquela de fármacos tradicionais como indometacina e dexametasona. Por fim, a demonstração de que a atividade da metformina se mantém com administrações repetidas em um modelo de dor neuropática é um resultado relevante quando se considera que pacientes com dores crônicas são tratados com fármacos analgésicos por longos períodos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a metformina apresenta atividade em modelos de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática e também em modelos de edema inflamatório e pleurisia. Embora a metformina seja um ativador da AMPK, outros mecanismos podem estar envolvidos na atividade antinociceptiva desse fármaco, incluindo a ativação de vias opioidérgicas, serotoninérgicas e de canais para potássio ATP-dependentes. Os resultados indicam que a metformina apresenta atividade mesmo quando a resposta inflamatória e a sensibilização das vias nociceptivas já estão estabelecidas e eficácia semelhante àquela de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos tradicionais. Esse perfil indica que a metformina possui potencial elevado para ser reposicionado como fármaco útil para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BARI, M.A.A. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 6, p.1608-1621, 2015.

ALESSANDRI, A.L.; SOUSA, L.P.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 139, n. 2, p. 189-212, 2013.

ALLEGRA, M.; IANARO, A.; TERSIGNI, M.; PANZA, E.; TESORIERE, L.; LIVREA, M.A. Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carrageenin-induced rat pleurisy. *Journal of Nutrition*, v. 144, n. 2, p. 185-192, 2014.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, v.1000, n.1-2, p.40-56, 2004.

ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrene. *European Journal of Pharmacology*, v. 444, n. 1-2, p. 47-52, 2002.

ALVES, D.P.; TATSUO, M.A.; LEITE, R.; DUARTE, I.D. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. *Life Sciences*, v. 74, n. 20, p. 2577-2591, 2004.

ARONSON, J. K. In: *Meyler's Side Effect of Drugs – The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*, 15th ed, Oxford: Elsevier, p. 2505-2507, 2006.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 8, p.673-683, 2004.

BAILEY, C.J.; DAY, C. Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International*, v. 21, n. 3, p. 115-117, 2004.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 14, n. 12, p. 436-41, 1993.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms and treatment. *Neurology*, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

BASBAUM, A.; BUSHNELL, M.C. Pain: basic mechanisms. In: GIAMBERARDINO, M. A. Pain – an updated review – International Association for the Study of Pain. Seattle: IASP Press, 2002. p. 3-7.

BASTOS, L. F. S.; COELHO, M. M. Drug repositioning: Playing dirty to kill pain. *CNS Drugs*, v. 28, n. 1, p.45-61, 2014.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BICCA, C.; RAMOS, F.L.P.; CAMPOS, V.R.; ASSIS, F.D.; PULCHINELLI, Jr A.; LERMEN, Jr N.; MARQUES, A.C.P.R.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R.R.; ANDRADA N.C. Abuso e dependência dos opioides e opiáceos. *Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira*, 2012.

BOLEN, S.; FELDMAN, L.; VASSY, J.; WILSON, L.; YEH, H.C.; MARINOPOULOS, S.; WILEY, C.; SELVIN, E.; WILSON, R.; BASS, E.B.; BRANCATI, F.L. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, v. 147, n. 6, p. 386-399, 2007.

BRITO, A.M.S. *Avaliação da atividade da leflunomida em modelos de dor nociceptiva, inflamatória e neuropática*. Orientador: Márcio de Matos Coelho. Co-orientador: Renes de Resende Machado. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BUGIANESI, E., GENTILCORE, E., MANINI, R., NATALE, S., VANNI, E., VILLANOVA, N., DAVID, E., RIZZETTO, M., MARCHESINI, G. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 100, n. 5, p. 1082-1090, 2005.

CAHOVA, M.; PALENICKOVA, E.; DANKOVA, H.; STICOVA, E.; BURIAN, M.; DRAHOTA, Z.; CERVINKOVA, Z.; KUCERA, O.; GLADKOVA, C.; STOPKA, P.; KRIZOVA, J.; PAPACKOVA, Z.; OLIYARNYK, O.; KAZDOVA, L. Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 309, n. 2, p. 100-111, 2015.

CANDELETTI, S.; ROMUALDI, P.; SPADARO, C.; SPAMPINATO, S.; FERRI, S. Studies on the antinociceptive effect of intrathecal salmon calcitonin. *Peptides*, v.6, n.3, p.273-276, 1985.

CARLING, D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 29, n. 1, p. 18-24, 2004.

CATALANO, E.M.; HARDIN, K.N. Dores crônicas. São Paulo: Summus Editorial, 2004.

CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. *The Lancet*, v. 353, n.9171, p. 2233-2237, 1999.

CHEN, P.C.; KRYUKOVA, Y.N.; SHYNG, S.L. Leptin regulates KATP channel trafficking in pancreatic β -cells by a signaling mechanism involving AMP-activated protein kinase (AMPK) and cAMP-dependent protein kinase (PKA). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 47, p. 34098-34109, 2013.

CHEN, X.; WALTHER, F.J.; SENGERS, R.M.; LAGHMANI, el H.; SALAM A.; FOLKERTS, G.; PERA, T.; WAGENAAR, G.T. Metformin attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by reducing the inflammatory response. *American Journal of Physiology. Lung Celular and Molecular Physiology*, v. 309, n. 3, p. 262-270, 2015.

CHENG, J.T.; HUANG, C.C.; LIU, I.M.; TZENG, T.F.; CHANG., C.J. Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, v. 55, n. 3, p. 819-825, 2006.

CHOI, Y.H.; KIM, S.G.; LEE, M.G. Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: Hepatic and gastrointestinal first-pass effects. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 95, n. 11, p. 2543-2552, 2006.

CHONG, C.R.; SULLIVAN, D.J.Jr. New uses for old drugs. *Nature*, v. 448, n. 7154, p. 645-646, 2007.

COHEN, S.P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, v. 348, doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.f7656>, 2014.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T (Eds.). Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999. Cap. 3, p. 50-88.

COTRAN, R.S.; KUMMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th ed. WB Saunders Co., Philadelphia, PA. 251–259, 1999.

CROFFORD, L.J.; LIPSKY, P.E.; BROOKS, P.; ABRAMSON, S.B.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheumatism*, v. 43, n. 1, p. 4-13, 2000.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S.C. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *British Journal of Pharmacology*, v. 42, n. 3, p. 392-402, 1971.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, v. 65, n. 1, p. 100-105, 2001.

DERRY, S.; WIFFEN P. J.; ALDINGTON D.; MOORE, R. A. Nortriptyline for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015.

DiMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, v. 22, n. 2, p. 151-185, 2003.

DiROSA, M. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 24, n. 2, p. 89-102, 1972.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

DUTRA, M.M.; GODIN, A.M.; CÉSAR, I.C.; NASCIMENTO, E.B. Jr; MENEZES, R.R.; FERREIRA, W.C.; SOARES, D.G.; SENIUK, J.G.; ARAÚJO, D.P.; BASTOS, L.F.; PIANNETI, G.A.; De FÁTIMA, Â.; MACHADO, R.R.; COELHO, M.M. Activity of nicorandil, a nicotinamide derivative with a nitrate group, in the experimental model of pain induced by formaldehyde in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 106, p. 85-90, 2013.

DWORKIN, R.H.; O'CONNOR, A.B.; BACKONJA, M.; FARRAR, J.T.; FINNERUP, N.B.; JENSEN, T.S.; KALSO, E.A.; LOESER, J.D.; MIASKOWSKI, C.; NURMIKKO, T.J.; PORTENOY, R.K.; RICE, A.S.; STACEY, B.R.; TREEDE, R.D.; TURK, D.C.; WALLACE, M.S. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*, v. 132, n. 3, p. 237-251, 2007.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 107, n. 3, p. 385-393, 1953.

FERREIRA, S.H. A new method for measuring variations of rat paw volume. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 31, n. 1, p. 648, 1979.

FERREIRA, S.H.; S.H. MONCADA; J.R. VANE. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *British Journal of Pharmacology*, v. 49, p. 86-97, 1973.

FORETZ, M.; GUIGAS, B.; BERTRAND, L.; POLLAK, M.; VIOLLET, B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metabolism*, v. 20, n. 6, p. 953-966, 2014.

FREDERICH, M.; O'ROURKE, M.R.; FUREY, N.B.; JOST, J.A. AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress. *The Journal of Experimental Biology*, v. 212, p.722-730, 2009.

FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 13, n. 3, p. 162-168, 2001.

FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 17, n. 3, p. 149-156, 2002.

FU, J.Y.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 28, p. 16737-16740, 1990.

FURST, D.E.; ULRICH, R.W. Fármacos anti-inflamatórios não esteroides, fármacos anti-reumáticos modificadores da doença, analgésicos não-opioides e fármacos usados no tratamento da gota. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007. Cap. 36, p. 515-538

GALLEGO, M.R. Terapêutica oral da diabetes tipo 2. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, v. 21, p. 575–584, 2005.

GALLUZZI, K.E. Managing neuropathic pain. *The Journal of the American Osteopathic Association*, v. 107, n. 10, s. 6, p. 39-48, 2007.

GASKIN, F.S.; KAMADA, K.; YUSOF, M.; DURANTE, W.; GROSS, G.; KORTHUIS, R.J. AICAR preconditioning prevents postischemic leukocyte rolling and adhesion: role of K(ATP) channels and heme oxygenase. *Microcirculation*, v.16, n. 2, p. 167-176, 2009.

GENTILLI, M.; MAZOIT, J.X.; BOUAZIZ, H.; FLETCHER, D.; CASPER, R.F.; BENHAMOU, D.; SAVOURET, J.F. Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life Sciences*, v. 68, n. 11, p. 1317-1321, 2001.

GHELARDINI, C.; Di CESARE MANNELLI, L.; BIANCHI, E. The pharmacological basis of opioids. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, v. 12, n. 3, p. 219-221, 2015.

GIRARD, P.; PANSART, Y.; COPPÉ, M.C.; VERNIERS, D.; GILLARDIN, J.M. Role of the histamine system in nefopam-induced antinociception in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 503, n. 1-3, p. 63-69, 2004.

GODIN, A.M.; FERREIRA, W.C.; ROCHA, L.T.; SENIUK, J.G.; PAIVA, A.L.; MERLO, L.A.; NASCIMENTO, E.B. Jr; BASTOS, L.F.; COELHO, M.M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of nicotinamide and its isomers in different experimental models. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 99, n. 4, p. 782-788, 2011.

GONG, L.; GOSWAMIC, S.; GIACOMINIC, Kathleen M.; ALTMANA, Russ B.; KLEIN, Teri E. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics*, v. 22, n. 11, p. 820–827, 2012.

GOODCHILD, C.S.; GUO, Z.; FREEMAN, J.; GENT, J.P. 5-HT spinal antinociception involves mu opioid receptors: cross tolerance and antagonist studies. *British Journal of Anaesthesia*, v. 8, n. 5, p. 563-569, 1997.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiology and Behavior*, v.47, n. 5, p.963-991, 1990.

GRAHAM, G.G.; PUNT, J.; ARORA, M.; DAY, R.O.; DOOGUE, M.P.; DUONG, J.; FURLONG, T.J.; GREENFIELD., J.R.; GREENUP, L.C.; KIRKPATRICK, C.M.; RAY, J.E.; TIMMINS, P.; WILLIAMS, K.M. .Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 50, n. 2, p. 81–98, 2011.

GROSSER, T.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G.A. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios; farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLMANN, B.C. (Eds.). Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica. 12a ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2012. Cap. 34, p. 959-1003.

GUI, Y.; LI, A.; CHEN, F.; ZHOU, H.; TANG, Y.; CHEN, L.; CHEN, S.; DUAN, S. Involvement of AMPK/SIRT1 pathway in anti-allodynic effect of troxerutin in CCI-induced neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, v. 15, n. 769, p. 234-241, 2015.

GUNN, A.; BOBECK, E.N.; WEBER, C.; MORGAN, M.M. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *The Journal of Pain*, v. 12. n. 2, p. 222-227, 2011.

HAN, Y.; JIANG, C.; TANG, J.; WANG; C.; WU, P.; ZHANG, G.; LIU, W.; JAMANGULOVA, N.; WU, X.; SONG, X. Resveratrol reduces morphine tolerance by inhibiting microglial activation via AMPK signalling. *European Journal of Pharmacology*, v. 18, n. 10, p. 1458-1470, 2014.

HARDIE, D.G. The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, v. 144, n. 12, p. 5179-5183, 2003.

HEAD, G.A; MAYOROV, D.N. Imidazoline receptors, novel agents and therapeutic potential. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, v. 4, n. 1, p.17-32, 2006.

HEHN, C.A.V.; BARON, R.; WOOLF, C.J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*, v. 73, n. 4, p. 638-652, 2012.

HIRSCH, H.A.; ILIOPULOS, D.; STRUHL, K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 3, p. 972-977, 2013.

HUNDAL, .R.S.; KRSSAK, .M.; DUFOR S.; LAURENT, D.; LEBON, V.; CHANDRAMOULI, V.; INZUCCHI, S.E.; SCHUMANN, W.C.; PETERSEN, K.F.; LANDAU, B.R.; SHULMAN, G.I. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 49, n. 12, p. 2063-2069, 2000.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

IASP 1: *IASP Taxonomy – Pain Terms*.

Disponível em:

<<http://www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions/>> Acesso em nov. 2015.

IBÁÑEZ, L.; ONG, K.; VALLS, C.; MARCOS, M.V.; DUNGER, D.B.; de ZEGHER, F. Metformin treatment to prevent early puberty in girls with precocious pubarche. *The Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism*, v. 91, n. 8, p. 2888-2891, 2006.

IKEMATSU, N.; DALLAS, M.L.; ROSS, F.A.; LEWIS, R.W. RAFFERTY, J.N.; DAVID, J.A.; SUMAN, R.; PEERS, C.; HARDIE, D.G., EVANS, A.M. Phosphorylation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by AMP-activated protein kinase regulates membrane excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 44, p.18132-18237, 2009.

JENSEN, T.S.; BARON, R.; HAANPA, M.; KALSO, E.; LOESER, J.D.; RICE, A.S.; TREEDE, R.D. A new definition of neuropathic pain. *Pain*, v. 152, n. 10, p. 2204-2205, 2011.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JÜRGENSEN, S.; DALBÓ, S.; ANGERS, P.; SANTOS, A.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 81, n. 3, p. 466-477, 2005.

KANG, K.Y.; KIM, Y.K.; YI, H.; KIM, J.; JUNG, H.R.; KIM, I.J.; CHO, J.H.; PARK, S.H.; KIM, H.Y.; JU, J.H. Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *International Immunopharmacology*, v. 16, n. 1, p. 85-92, 2013.

KATO, Y.; KOIDE, N.; KOMATSU, T.; TUMURKHUU, G.; DAGVADORJ, J.; KATO, K.; YOKOCHI, T. Metformin attenuates production of nitric oxide in response to lipopolysaccharide by inhibiting MyD88-independent pathway. *Hormone and Metabolic Research*, v. 42, n. 9, p. 632-636, 2010.

KHANNA, N.; MALHOTRA, R.S.; MEHTRA, A.K.; GARG, G.R.; HALDER, S.; SHARMA K.K. Interaction of morphine and potassium channel openers on experimental models of pain in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 25, n. 4, p. 479-484, 2011.

KILO, C.; MEZITIS, N.; JAIN, R.; MERSEY, J.; MCGILL, J., RASKIN, P. Starting patients with type 2 diabetes on insulin therapy using once-daily injections of biphasic insulin aspart 70/30, biphasic human insulin 70/30, or NPH insulin in combination with metformin. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 17, n. 6, p. 307-3, 2003.

KIM, P.K.; DEUTSCHMAN, C.S. Inflammatory responses and mediators. *Surgical Clinics of North America*, v. 80, n. 3, p. 885-894, 2000.

KISSIN, I. The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Anesthesia & Analgesia*, v. 110, n. 3, p. 780-789, 2010.

KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W.; HERSCHMAN H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 20, p. 12866-12872, 1991.

LANDERS, L. Drug industry's big push into technology falls short. Disponível em: <<http://online.wsj.com/article/0,,SB107758348388437255,00.html>>. Acesso em: 01/12/2015

LeBARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2000.

LEE, J.P.; CHEN, W.; WU, H.T.; LIN, K.C.; CHENG, J.T. Metformin can activate imidazoline I-2 receptors to lower plasma glucose in type 1-like diabetic rats. *Hormone and Metabolic Research*, v. 43, n. 1, p. 26-30, 2011.

LEE, S.Y.; LEE, S.H.; YANG, E.J.; KIM, E.K.; KIM, J.K.; SHIN, D.Y.; CHO, M.L. Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the stat3 signaling pathway and regulation of the between th17/treg balance. *PLoS One*, v. 10, n. 9, 2015.

LEMONICA, Lino. Bases farmacológicas para uso clínico de opioides. *Práctica Hospitalar*, n. 56, p. 129-135, 2008.

LEÓN-REYES, R. B.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; ORTIZ, M. I. Pharmacokinetic of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 12, n. 3, p. 280-287, 2009.

LI, J.X.; THORN, D.A.; QIU, Y.; PENG, B.W.; ZHANG, Y. Antihyperalgesic effects of imidazoline I(2) receptor ligands in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 6, p. 1580-1590, 2014.

LI, J.X.; ZHANG, Y. Imidazoline I2 receptors: target for new analgesics? *European Journal of Pharmacology*, v. 658, n. 2-3, p. 49-56, 2011.

LI, L.; ZHANG, H.; LI, T.; ZHANG, B. Involvement of adenosine monophosphate-activated protein kinase in morphine-induced cardioprotection. *Journal of Surgical Research*, v. 169, n. 2, p. 179-187, 2011.

LI, S.N.; WANG, X.; ZENG, Q.T.; FENG, Y.B.; CHENG, X.; MAO, X.B.; WANG, T.H.; DENG, H.P. Metformin inhibits nuclear factor kappaB activation and decreases serum high-sensitivity C-reactive protein level in experimental atherogenesis of rabbits. *Heart and Vessels*, v. 24, n. 6, p. 446-453, 2009.

LIMA, F.O.; SOUZA, G.R.; VERRI, W.A. Jr.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA F.Q.; CUNHA T.M. Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. *Pain*, v. 151, n. 2, p. 506-515, 2010.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LOH, H.H.; TSENG, L.F.; WEI, E.; LI, C.H. Beta-endorphin is a potent analgesic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 73, n. 8, p. 2895-2898, 1976.

LORD, J.M.; FLIGHT, I.H.K.; NORMAN, R.J. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, v. 327, n. 951, 2003.

LUCHESE, C.; PRIGOL, M.; DUARTE, M.M.; NOGUEIRA C.W. Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. *Inflammation Research*, v. 61, n. 10, p. 1117-1124, 2012.

LUZI, L.; POZZA, G. Glibenclamide: an old drug with a novel mechanism of action? *Acta Diabetologica*, v. 34, n. 4, p. 239-244, 1997.

MA, J.; YU, H.; LIU, J.; CHEN, Y.; WANG, Q.; XIANG, L. Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin. *European Journal of Pharmacology*, v. 5, n. 764, p. 599-606, 2015.

MAIXNER, D.W.; YAN, X.; GAO, M.; YADAV, R.; WENG, H.R. Adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates interleukin-1 β expression and glial glutamate transporter function in rodents with neuropathic pain. *Anesthesiology*, v. 122, n. 6, p. 1401-1413, 2015.

MAO-YING, Q.L.; KAVELAARS, A.; KRUKOWSKI, K.; HUO, X.J.; ZHOU, W.; PRICE, T.J.; CLEELAND, C.; HEIJNEN, C.J. The anti-diabetic drug metformin protects against chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a mouse model. *PLoS One*, v. 9, n. 6, 2014.

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; BIANCHI, G.; TOMASSETTI, S.; ZOLI, M.; MELCHIONDA, N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet*, v. 358, n. 9285, p. 893-894, 2001.

MARQUEZ, J. O. A dor e os seus aspectos multidimensionais. *Ciência e Cultura*, v. 63, n. 2, p. 28-32, 2011.

MATSUI, T.C; COURA, G.M.; MELO, I.S.; BATISTA, C.R.; AUGUSTO, P.S.; GODIN, A.M.; ARAÚJO, D.P.; CÉSAR, I.C.; RIBEIRO, L.S.; SOUZA, D.G.; KLEIN, A.; De FÁTIMA, Â.; MACHADO, R.R.; COELHO, M.M. Nicorandil inhibits neutrophil recruitment in carrageenan-induced experimental pleurisy in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 15, n. 769, p. 306-312, 2015.

MATSUMIYA, L.C.; SORGE, R.E; SOTOCINAL, S.G.; TABAKA, J.M.; WIESKOPF, J.S; ZALOUM, A.; KING, O.D.; MOGIL, J.S. Using the mouse grimace scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 51, n. 1, p. 42-49, 2012.

McMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.; MARCHAND F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Experimental Neurology*, v. 192, n. 2, p. 444-462, 2005.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MELEMEDJIAN, O.K.; ASIEDU, M.N.; TILLU, D.V.; SANOJA, R.; YAN, J.; LARK, A.; KHOUTORSKY, A.; JOHNSON J.; PEEBLES, K.A.; LEPOW, T.; SONENBERG N.; DUSSOR, G.; PRICE, T.J. Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Molecular Pain*, v. 7, n. 70, 2011.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *European Journal of Pain*, v. 1, n. 1, p. 43-52, 1997.

MESDJIAN, E.; DeFEUDIS, F.V.; VALLI, M.; JADOT, G.; MANDEL, P. Antinociceptive action of sodium valproate in the mouse. *General Pharmacology*, v. 14, n. 6, p. 697-699, 1983.

MICOV, A.; TOMIĆ, M.; POPOVIĆ, B.; STEPANOVIĆ-PETROVIĆ, R. The antihyperalgesic effect of levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: mechanism of action. *British Journal of Pharmacology*, v. 161, n. 2, p. 384-392, 2010.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, v. 57, n.1, p.1-164, 1999.

MOGIL, J.S.; CRAGER, S.E. What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain*, v. 112, n. (1-2), p. 12-15, 2004.

MONTES, J.; PACHECO, K.; FIGUEROA, J.; INGA, V.; ORTEGA, Y.; CATERÍN, F.; ACOSTA, E.; TORRES, V.; SALAZAR, A. Analysis of the anti-inflammatory and acute analgesic activity of metformin through the formalin test. *Revista Horizonte Médico*, Lima, v. 2, n. 12, p. 37-42, 2012.

MOORE, R. A.; DERRY, S.; COLE, P.; WIFFEN, P. J. Amitriptyline for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*, v. 225, p. 115-121, 2003.

MOTTA, P. G.; PEREZ, A.C.; ALVES, D.P.; DUARTE, I.D. Peripheral control of inflammatory but not neuropathic pain by endogenous cholinergic system. *Pharmacology*, v. 88, n. 1-2, p. 18-25, 2011.

MUKHERJEE, G.; TOPOL, E.J. Cyclooxygenase-2: where are we in 2003? Cardiovascular risk and COX-2 inhibitors. *Arthritis Research & Therapy*, v. 5, n. 1, p. 8-11, 2003.

MUSI, N.; HIRSHMAN, M.F.; NYGREN, J.; SVANFELDT, M.; BAVENHOLM, P.; ROOYACKERS, O.; ZHOU, G.; WILLIAMSON, J.M.; LJUNQVIST, O.; EFENDIC, S.; MOLLER, D.E.; THORELL, A.; GOODYEAR, L.J. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 51, n. 7, p. 2074-2081, 2002.

NAGASAKO, E.M.; OAKLANDER, A.L.; DWORKIN, R.H. Congenital insensitivity to pain: an update. *Pain*, v. 101, n. 3, p. 213-219, 2003.

NIE, H.; WENG H.R. Impaired glial glutamate uptake induces extrasynaptic glutamate spillover in the spinal sensory synapses of neuropathic rats. *Journal of Neurophysiology*, v.103, n.5, p. 2570–2580, 2010.

NIEMAN, L.K. Cushing's syndrome: update on signs, symptoms and biochemical screening. *European Journal of Endocrinology*, v.173, n. 4, p. 33-38, 2015.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F.M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends in Immunology*, v. 26, n. 3, p. 157-165, 2005.

OJUGAS, A.C. A dor através da história e da arte. Cleveland: Atlas Medical Publishing; 1999. 159 p.

OPROMOLLA, D.V.A. O tratamento das reações na hanseníase. *Hansen International*, v. 25, n. 1, p. 1-3, 2000

PARK, C.S.; BANG, B.R.; KWON, H.S.; MOON, K.A.; KIM, T.B.; LEE, K.Y.; MOON, H.B.; CHO, Y.S. Metformin reduces airway inflammation and remodeling via activation of AMP-activated protein kinase. *Biochemical Pharmacology*, v. 84, n. 12, p. 1660-1670, 2012.

PARK, D.W.; JIANG, S.; TADIE, J.M.; STIGLER, W.S.; GAO, Y.; DESHANE, J.; ABRAHAM, E.; ZMIJEWSKI, J.W. Activation of AMPK enhances neutrophil chemotaxis and bacterial killing. *Molecular Medicine*, v. 8, n. 19, p. 387-398, 2013.

PERCIE du SERT, N.; RICE, A.S. Improving the translation of analgesic drugs to the clinic: animal models of neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 12, p.2951–2963, 2014

PHAM-MARCOU, T.A., BELOEIL, H., SUN, X., GENTILLI, M., YAICI, D., BENOIT, G., BENHAMOU, D., MAZOIT, J.X. Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain*, v. 140, n. 2, p. 274-283, 2008.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PRICE, T.J.; DUSSOR, G. AMPK: An emerging target for modification of injury-induced pain plasticity. *Neuroscience Letter*, v. 557, p. 9-18, 2013.

PRICE, T.J.; DAS, V.; DUSSOR, G. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activators for the prevention, treatment and potential reversal of pathological pain. *Current Drugs Targets*, v. 17, n. 6, 2015.

RAINVILLE, P. Brain Mechanisms of pain affect and pain modulation. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 12, n. 2, p. 195-204, 2002.

RAMAMURTHY, S.; ALANMANOU, E.; ROGERS, J.N. Decision making in pain management. 2. ed, New York: Mosby Year Book, 1993

RAMESHRAD, M.; SORAYA, H.; MALEKI-DIZAJI, N.; VAEZ, H.; GARJANI, A. A-769662, a direct AMPK activator, attenuates lipopolysaccharide-induced acute heart and lung inflammation in rats. *Molecular Medicine Reports*, doi: 10.3892/mmr., 2016.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. Fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores. In: RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. Farmacologia. 6ª Ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Cap. 14, p. 226-247.

Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2014 / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – 9. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 228 p.

ROCHA e SILVA, M.; GARCIA LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. Oxford: Pergamon, 1972. 425 p.

RODRIGUES, A.R., CASTRO, M.S., FRANCISCHI, J.N., PEREZ, A.C., DUARTE, I.D. Participation of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect of fentanyl in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.38, n. 1, p. 91-97, 2005.

ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Modification of the antinociceptive effect of morphine by acute and chronic administration of clomipramine in mice. *Pain*, v. 33, n. 3, p. 349-355, 1988.

RUSSE, O.Q.; MÖSER, C.V.; KYNAST, K.L.; KING, T.S.; STEPHAN, H., GEISLINGER, G., NIEDERBERGER, E. Activation of the AMP-activated protein kinase reduces inflammatory nociception. *The Journal of Pain*, v.14, n. 11, p. 1330-1340, 2013.

SAISHO, Y. Metformin and inflammation: its potential beyond glucose-lowering effect. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, v. 15, n. 3, p. 196-205, 2015.

SALPETER, S.R.; GREYBER, E.; PASTERNAK, G.A., SALPETER, E.E. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, v. 163, n. 21, 2594-2602, 2003.

SANTOMAURO, A.C. Jr.; UGOLINI, M.R.; SANTOMAURO, A.T.; Do SOUTO, R.P. Metformina e ampk: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 1, n. 52, p.120-125, 2007.

SANTOS, F.L. A.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; SILVA, K.E.R.; ROLIM, L. A.; GOMES, T.C.B.L.; FERRAZ, L.R.M.; LIMA, A.A.N.; SOBRINHO, J.L.S.; NETO, P.J.R. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 33, n. 1, p. 37-47, 2012.

SARDANA, D.; ZHU, C.; ZHANG, M.; GUDIVADA, R.C.; YANG, L.; JEGGA, A.G. Drug repositioning for orphan diseases. *Briefings in Bioinformatics*, v. 12, n. 4, p. 346-356, 2011.

SATOH, M.; MINAMI, M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 68, n. 3, p. 343-364, 1995.

SCHIMMACK, G.; DEFONZO, R.A.; MUSI, N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 8, n. 6, p. 591-602, 2006.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience, suppl.*, p. 1062-1067, 2002.

SELPH, S.; CARSON, S.; FU, R.; THAKURTA, S.; LOW, A.; McDONAGH, M. Drug Class Review: Neuropathic Pain. *Drug Class Review*, 2011.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SHEN K.Z.; YAKHNITSA, V.; MUNHALL, A.C.; JOHNSON, S.W. AMP kinase regulates K-ATP currents evoked by NMDA receptor stimulation in rat subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience*, v. 274, p. 138-152, 2014.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SILVA, R.C.; PARDINI, D.P.; KATER, C.E. Síndrome dos ovários policísticos, síndrome metabólica, risco cardiovascular e o papel dos agentes sensibilizadores da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 50, n. 2, p. 281-290, 2006.

SLEIGH, S. H.; BARTON, C. L. Repurposing strategies for therapeutics. *Pharmaceutical Medicine.*, v. 24, n. 3, p. 151-159, 2010.

SMITH, B.H.; TORRANCE, M. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. *Current Pain and Headache Reports*, v. 16, n. 3, p. 191-198, 2012.

SONG, H.; HAN Y.; PAN, C.; DENG, X.; DAÍ, W.; HU, L.; JIANG, C.; YANG, Y.; CHENG Z.; LI, F.; ZHANG, G.; WU, X.; LIU, W. Activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses neuroinflammation and ameliorates bone cancer pain: involvement of inhibition on mitogen-activated protein kinase. *Anesthesiology*, v. 123, n. 5, p. 1170-1185, 2015.

SOUZA, A.L.S.; MOREIRA, F.A.; ALMEIDA, K.R.; BERTOLLO, C.M.; COSTA, K.A.; COELHO, M.M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, n. 1, p.239-247, 2002.

STAHN, C.; BUTTGEREIT, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature Clinical Practice in Rheumatology*, v. 4, n. 10, p. 525-533, 2008.

STONE, C.A.; WENGER, H.C.; LUDDEN, C.T.; STAVORSKI, J.M.; ROSS, C.A. Antiserotonin-antihistaminic properties of cyproheptadine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 131, n. 1, p. 73-84, 1961.

STUMVOLL, M. M.; NURJHAN, N.; PERRIELLO, G.; DAILEY, G.; GERICH, J.E. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, v.333, n. 9, p. 550-554, 1995.

SUNG, B.; LIM, G.; MAO, J. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *The Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 7, p. 2899-2910, 2003.

SWAMIDASS, S. J. Mining small-molecule screens to repurpose drugs. *Briefings in Bioinformatics*, v. 12, n. 4, p. 327-335, 2011.

TAYLOR, A.; WESTVELD, A.H.; SZKUDLINSKA, M.; GURUGURI, P.; ANNABI, E.; PATWARDHAN, A.; PRICE, T.J.; YASSINE, H.N. The use of metformin is associated with decreased lumbar radiculopathy pain. *Journal of Pain Research*, v. 9, n. 6, p. 755-763, 2013.

THONGPRADICHOTE, S.; MATSUMOTO, K.; TOHDA, M.; TAKAYAMA, H.; AIMI, N.; SAKAI, S.; WATANABE, H. Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice. *Life Sciences*, v. 62, n. 16, p. 1371-1378, 1998.

TILLU, D.V.; MELEMEDJIAN, O.K.; ASIEDU, M.N.; QU, N.; De FELICE, M.; DUSSOR, G.; PRICE, T.J. Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain. *Molecular Pain*, v.8, n.5, 2012.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, v. 21, n.3, p. 531-543, 1998.

UFSJ: *Linhagens de Animais*

Disponível em: <<http://ufsj.edu.br/bioterio/animais.php>> Acesso em fev. 2016.

VALLEJO, R.; TILLEY, D.M.; VOGEL, L.; BENYAMIN, R. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Practice* v. 10, n. 3, p. 167-184, 2010.

van der VELDEN, V.H. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators of Inflammation*, v. 7, n. 4, p. 229-237, 1998.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

VASAMSETTI, S.B.; KARNEWAR, S.; KANUGULA, .AK.; THATIPALLI, A.R.; KUMAR, J,M, KOTAMJARU, S. Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. *Diabetes*, v. 64, n. 6, p. 2028-2041, 2015.

VAZ, Z.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 278, p. 304 –312, 1996.

VIGUIER, F.; MICHOT, B.; HAMON, M.; BOURGOIN, S. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. *European Journal of Pharmacology*, v. 716, n. 1-3, p. 8-16, 2013.

WEISSMAN, G. Inflammation: Historical perspectives. In Gallin, J.I.; SNYDERMAN, R.; FEARON, D.T.; HAYNES, B.F.; NATHAN, C.N. (eds.): *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2 ed. New York, Raven Press, p. 5-13, 1992.

WITTERS, L.A. The blooming of the French lilac. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 108, n. 8, p. 1105-1107, 2001.

WOOLF, C.J. Neurobiological Disease. *Pain*, v.7, n.5, p.504-510, 2000.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic treatment. *Annals of Internal Medicine*, v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 80, p. 300-307, 1944.

XIE, W.L.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, 1991.

XU, W.; DENG, Y.Y.; YANG, L.; ZHAO, S.; LIU, J.; ZHAO, Z.; WANG, L.; MAHARJAN, P.; GAO, S.; TIAN, Y.; ZHUO, X.; ZHAO, Y.; ZHOU, J.; YUAN, Z.; WU, Y. Metformin ameliorates the proinflammatory state in patients with carotid artery atherosclerosis through sirtuin 1 induction. *Translational Research*, v. 166, n. 5, p. 451-458, 2015.

YAKSH, T.L. Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Research*, v. 160, n. 1, p. 180-185, 1978.

YAKSH, T.L.; WALLACE, M.S. Opioides, analgesia e tratamento da dor. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLMANN, B.C. (Eds.). Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica. 12a ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2012. Cap. 18, p. 481-525.

YAN X.; YADAV R.; GAO M.; WENG H.R. Interleukin-1 beta enhances endocytosis of glial glutamate transporters in the spinal dorsal horn through activating protein kinase C. *Glia*, v. 62, n. 7, p. 1093-1109, 2014.

YANG, S.W.; KANG, Y.M.; GUO, Y.Q.; QIAO, J.T.; DAFNY, N. ATP-sensitive potassium channels mediate norepinephrine- and morphine-induced antinociception at the spinal cord level. *International Journal of Neuroscience*, v. 93, n. 3-4, p. 217-223, 1998.

YAO, F.; JI, G.Y., ZHANG, L. AMPK: a novel target controlling inflammation. *Acta Physiologica Sinica*, v. 64, n. 3, p. 341-345, 2012.

YEE, S.W.; LIN, L.; MERSKI, M.; KEISER, M.J.; GUPTA, A.; ZHANG, Y.; CHIEN H.C.; SHOICHET, B.K.; GIACOMINI, K.M. Prediction and validation of enzyme and transporter off-targets for metformin. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, v. 42, n. 5, p. 463-475, 2015.

YUAN, H.; LI, L.; ZHENG, W.; WAN, J.; GE, P.; LI, H.; ZHANG, L. Antidiabetic drug metformin alleviates endotoxin-induced fulminant liver injury in mice. *International Immunopharmacology*, v. 12, n. 4, p. 682-688, 2012.

ZANG, M.; ZUCCOLLO, A.; HOU, X.; NAGATA, D.; WALSH, K.; HERSCOVITZ, H.; BRECHER, P.; RUDERMAN, N.B.; COHEN, R.A. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 46, p. 47898-47905, 2004.

ZHANG, X.J.; ZHANG, T.W.; HU, S.J; XU, H. Behavioral assessments of the aversive quality of pain in animals. *Neuroscience Bulletin* v. 27, n. 1, p. 61-67, 2011.

ZHENG, J.; WOO, S.L.; HU, X.; BOTCHLETT, R.; CHEN, L.; HUO, Y.; WU, C. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Frontiers of Medicine*, v. 9, n. 2, p. 173-186, 2015.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M.F.; GOODYEAR, L.J.; MOLLER, D.E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of Clinical Investigation*, v.108, n. 8, p. 1167-74, 2001.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.