

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

MARCELA ÍSIS MORAIS

**NICORANDIL INIBE A ALODÍNIA MECÂNICA EM MODELOS DE DOR
NEUROPÁTICA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE MECANISMOS
OPIOIDÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS**

Belo Horizonte

2017

MARCELA ÍSIS MORAIS

**NICORANDIL INIBE A ALODÍNIA MECÂNICA EM MODELOS DE DOR
NEUROPÁTICA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE MECANISMOS
OPIOIDÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS**

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 mestra em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Renes de Resende Machado

Coorientador: Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho

Belo Horizonte

2017

M827n Morais, Marcela Ísis.
Nicorandil inibe a alodínia mecânica em modelos de dor neuropática por meio da ativação de mecanismos opioidérgicos e serotoninérgicos / Marcela Ísis Morais. – 2017.
86 f.: il.

Orientador: Renes de Resende Machado.
Coorientador: Márcio de Matos Coelho.

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

1. Nicorandil – Teses. 2. Nicotinamida – Teses. 3. Ácido nicotínico – Teses. 4. Dor neuropática – Teses. 5. Doxorrubicina – Teses. 6. Paclitaxel – Teses. I. Machado, Renes de Resende. II. Coelho, Márcio de Matos. 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

NICORANDIL INIBE A ALODÍNIA MECÂNICA EM MODELOS DE DOR NEUROPÁTICA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE MECANISMOS OPIOIDÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS

MARCELA ÍSIS MORAIS

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

Aprovada em 23 de fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Renes de Resende Machado - Orientador
UFMG


Prof. Marco de Melo Coelho - Coorientador
UFMG


Prof. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira
UFMG


Prof. Micheline Rosz Silveira
UFMG

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2017.

Dedico o grau de mestra

À minha mãe, ao Léo, à Laíza e ao Felipe, que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força diária para buscar meus objetivos.

À minha mãe, base e fortaleza de todas as minhas conquistas.

Ao meu padrasto Israel, por todo o apoio e incentivo.

À minha irmã Laíza, pela confiança e companheirismo.

Ao Felipe, por todo o carinho, incentivo, paciência e contribuição.

A todos os familiares, que, de alguma forma, contribuíram para alcançar esta meta.

Ao Prof. Dr. Renes, por toda disponibilidade, apoio, paciência, auxílio constante nos procedimentos do laboratório, incentivo e exemplo de uma pessoa humana, humilde e sábia. Obrigada pela oportunidade de poder trabalhar ao seu lado. Sem dúvidas, a sua presença foi indispensável para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Márcio, pelo exemplo de experiência, conhecimento e humildade. Pelos conselhos e disponibilidade. Obrigada, também, pela amizade e oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Ângelo de Fátima, por gentilmente fornecer o nicorandil e pela colaboração.

Aos alunos de iniciação científica Sarah, Fábio, Franciele e Hellen, pelo companheirismo e grande auxílio na execução dos procedimentos laboratoriais.

Aos alunos de mestrado e doutorado Ivo, Paulo e Marcela Bini, pelo apoio e conselhos. Em especial, agradeço ao amigo Felipe, pelo bom humor diário e incentivo nesta caminhada.

À Adelaide e ao Batista, pela constante disponibilidade para fornecer os animais para os procedimentos.

À professora Sheila, pela agradável convivência durante o estágio em docência. Seus conselhos foram muito importantes para o meu desenvolvimento.

Ao Márton, funcionário do PPGCF, pelo coleguismo e disponibilidade para fornecer as informações necessárias durante o mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”.
John Dewey

RESUMO

A dor neuropática é uma desordem geralmente associada a lesões ou doenças que afetam o sistema nervoso central ou o sistema nervoso periférico. A dor neuropática pode resultar da alteração de vários mecanismos neuroquímicos e caracteriza-se por uma refratariedade às terapias analgésicas convencionais. Estima-se que apenas 25% dos pacientes com dor neuropática apresentam um alívio superior a 50% com o uso dos fármacos disponíveis. O nicorandil é um fármaco usado em alguns países no tratamento de pacientes com *angina pectoris* e tem a capacidade de liberar NO e promover a abertura de canais para K⁺ ATP-dependentes. Estudos recentes demonstraram a atividade do nicorandil em modelos de dores inflamatória e nociceptiva, o que justifica a avaliação deste fármaco em modelos de dor neuropática. Assim, os efeitos induzidos pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, p.o.) foram avaliados nos modelos de dor neuropática induzida por paclitaxel (2 mg/kg, 2 mL/kg, i.p.) ou por constrição do nervo isquiático em camundongos Swiss machos (25-30 g). O nicorandil inibiu a alodínia mecânica quando administrado uma ou duas vezes no sétimo e no décimo quarto dia após a primeira injeção de paclitaxel, sendo que os resultados mais significativos foram observados quando este fármaco foi administrado duas vezes, em um intervalo de duas horas. Doses equimolares de ácido nicotínico ou nicotinamida não induziram efeito antinociceptivo. Quando o efeito induzido pelo nicorandil foi avaliado após administrações repetidas (100 ou 150 mg/kg, 2 vezes, p.o.), a atividade antinociceptiva se manteve após duas administrações adicionais, no 15º e no 16º dia. O nicorandil também apresentou atividade antinociceptiva no modelo de dor neuropática induzida por constrição do nervo isquiático. A atividade antinociceptiva do nicorandil não foi associada ao comprometimento da atividade motora avaliada na haste girante (14 rpm, 2 min). A administração prévia de naltrexona (5 ou 10 mg/Kg, i.p., -15 min), glibenclamida (20 ou 40 mg/kg, p.o., -30 min) ou ciproheptadina (5 ou 10 mg/kg, i.p. -15 min) foi realizada para investigar possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do nicorandil no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel. Os resultados indicam a participação de receptores opioidérgicos e serotoninérgicos, mas não de canais para potássio ATP-dependentes. Concluindo, os resultados demonstram que o nicorandil apresenta atividade nos modelos de dor neuropática induzida por paclitaxel ou por constrição do nervo isquiático. Essa atividade não parece ser mediada pela nicotinamida ou pelo ácido nicotínico. Receptores opioidérgicos e serotoninérgicos possivelmente medeiam a atividade antinociceptiva do nicorandil. Os resultados demonstram que o nicorandil pode representar uma alternativa importante na farmacoterapia de pacientes com dor neuropática e servem de estímulo à realização de ensaios pré-clínicos e clínicos adicionais para investigar o potencial uso desse fármaco como analgésico.

Palavras-chave: nicorandil, nicotinamida, ácido nicotínico, dor neuropática, paclitaxel.

ABSTRACT

Neuropathic pain is a chronic disorder usually associated with central or peripheral nervous system lesions or diseases. A myriad of neurochemical mechanisms may contribute to establishment of neuropathic pain, thus contributing to the refractoriness to the traditional analgesic therapies. As low as 25% of the patients exhibiting neuropathic pain get a relief greater than 50% after using the available analgesic medicines. Nicorandil, a drug that releases NO and opens ATP-sensitive potassium channels, has been approved in some countries to treat patients with angina pectoris. The activity of nicorandil in models of nociceptive and inflammatory pain has been recently demonstrated, thus justifying additional investigations in models of neuropathic pain. In the present study, the effect induced by nicorandil (50, 100 or 150 mg/kg, p.o.) were investigated in the models of neuropathic pain induced by paclitaxel (2 mg/kg, 2 mL/kg, i.p.) or chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice. Nicorandil inhibited the mechanical allodynia induced by paclitaxel when administered once or twice in the seventh or fourteenth day after injection of paclitaxel. The activity was greater when the drug was administered twice in a 2 h interval. Equimolar doses of nicotinic acid or nicotinamide did not induce antinociceptive activity. The antinociceptive activity of nicorandil (100 and 150 mg/kg, 2x) was not changed after two additional administrations in the fifteenth and sixteenth days. Nicorandil also exhibited activity in the model of neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve. The antinociceptive activity of nicorandil was not associated with motor activity impairment. To investigate mechanisms involved in the antinociceptive activity of nicorandil, the animals were previously treated with naltrexone (5 or 10 mg/Kg, i.p., -15 min), glibenclamide (20 or 40 mg/kg, p.o., -30 min) or ciproheptadine (5 or 10 mg/kg, i.p. -15 min). The results indicate that activation of opioidergic and serotonergic receptors, but not ATP-sensitive potassium channels, mediate the antinociceptive activity of nicorandil. Concluding, the results demonstrate that nicorandil exhibit activity in the models of neuropathic pain induced by paclitaxel and chronic constriction injury. It seems that conversion to nicotinamide or nicotinic acid is not essential to the activity of nicorandil. This activity may be mediated by activation of opioidergic and serotonergic receptors, but not ATP-sensitive potassium channels. The results indicate that nicorandil may represent a pharmacotherapeutic strategy in the treatment of patients with neuropathic pain and justify additional preclinical and clinical assays aiming to evaluate its potential use as an analgesic drug.

Keywords: nicorandil, neuropathic pain, paclitaxel, nicotinamide, nicotinic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modalidades de dor de acordo com a etiologia.....	23
Figura 2 - Da etiologia à dor neuropática.....	24
Figura 3 - Sensibilização de um nociceptor.....	25
Figura 4 - Síntese do óxido nítrico.....	34
Figura 5 - Reação catalisada pela NO sintase	34
Figura 6 - Biotransformações do nicorandil: desnitração conduzindo à N- (2-hidroxi- etil) nicotinamida inativa, e a redução da cadeia alquila, conduzindo ao ácido nicotínico.	37
Figura 7- Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica.....	45
Figura 8 - Primeiro protocolo (uma administração de nicorandil no 7º dia)	46
Figura 9 - Segundo protocolo (duas administrações de nicorandil no 7º dia) ...	46
Figura 10 - Terceiro protocolo (uma administração de nicorandil no 14º dia)....	47
Figura 11 - Quarto protocolo (duas administrações de nicorandil no 14º dia)...	47
Figura 12 - Quinto protocolo (duas administrações de nicorandil no 14º, 15º e 16º dias)	48
Figura 13 - Sexto protocolo (duas administrações de nicorandil, nicotinamida e ácido nicotínico no 14º dia).....	48
Figura 14 – Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental de constrição do nervo isquiático.....	49
Figura 15 - Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil, após tratamento prévio com naltrexona ou ciproheptadina, sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel.	50
Figura 16 - Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil, após tratamento prévio com glibenclamida, sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel.	50
Figura 17 - Haste girante utilizada para avaliar a atividade motora de camundongos.....	51
Figura 18 - Escala temporal de avaliação da atividade motora em camundongos.....	51
Figura 19 – Curso temporal da alodínia mecânica induzida por paclitaxel.....	53
Figura 20 – Variações de massas corporais dos animais que receberam paclitaxel ou salina estéril	54

Figura 21 - Efeito induzido pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, uma administração, <i>p.o.</i> , 7° dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel	55
Figura 22 - Efeito induzido pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, duas administrações, <i>p.o.</i> , 7° dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	56
Figura 23 - Efeito induzido pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, uma administração, <i>p.o.</i> , 14° dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel	58
Figura 24 - Efeito induzido pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, duas administrações, <i>p.o.</i> , 14° dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	59
Figura 25 - Efeito induzido por administrações repetidas de nicorandil (100 ou 150 mg/kg, duas administrações, <i>p.o.</i>) no 14°, 15° e 16° dias sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	61
Figura 26 - Efeito induzido pelo nicorandil (150 mg/kg; <i>p.o.</i>) ou por doses equimolares de nicotinamida (86,7 mg/kg; <i>p.o.</i>) ou ácido nicotínico (87,7 mg/kg; <i>p.o.</i>) sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel.....	63
Figura 27 - Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático em camundongos.....	64
Figura 28 - Efeito induzido pelo nicorandil (150 mg/kg; <i>p.o.</i>) sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático.....	65
Figura 29 - Efeito induzido pela naltrexona (Nal; 5 ou 10 mg/kg, <i>i.p.</i>) sobre a atividade antialodínica do nicorandil (NIC; 150 mg/kg, <i>p.o.</i>). A naltrexona foi administrada 15 min antes do nicorandil.....	66
Figura 30 - Efeito induzido pela glibenclamida (Glib; 20 ou 40 mg/kg, <i>p.o.</i>) sobre a atividade antialodínica do nicorandil (NIC; 150 mg/kg, <i>p.o.</i>).....	68
Figura 31 - Efeito induzido pela ciproheptadina (cipro; 5 ou 10 mg/kg, <i>i.p.</i>) sobre a atividade antialodínica do nicorandil (NIC; 150 mg/kg, <i>p.o.</i>)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos induzidos pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h e + 2 h) ou pelo fenobarbital (50 mg/kg, <i>p.o.</i> , -1 h) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante	62
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HT – 5-hidroxitriptamina

AMPA – Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATP – Trifosfato de adenosina

Cipro - Ciproheptadina

CMC – Carboximetilcelulose

GC – Guanilato ciclase

GCa – Guanilato ciclase ativada

Glib – Glibenclamida

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

h - Hora

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

i.p. – Intraperitoneal

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

N – Newton

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida

Nal – Naltrexona

NAv – Canal para sódio ativado por voltagem

NGF – Fator de crescimento de nervo

NHA – N^G-hidroxi-L-arginina

NIC – Nicorandil

NMDA – N-metil D-aspartato

NO – Óxido Nítrico

p.o. – *per os*

PKA – Proteína quinase A

PKB – Proteína quinase B

PKC – Proteína quinase C

PP – Ponteira de polietileno

rpm – Rotações por minuto

SIN-1 – 3-morfolinosidnonimina

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TF – Transdutor de força

TGF- β – Fator de crescimento transformante beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRP – Receptor potencial transiente

TRPA1 – Receptor potencial transiente ankiryln 1

TRPV1 – Receptor potencial transiente vaniloide 1

TRPV4 – Receptor potencial transiente vaniloide 4

TTX-R – Canal de sódio resistente à tetrodotoxina

TTX-S – Canal de sódio sensível à tetrodotoxina

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

v – Volume

δ – Delta

κ – Kappa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aspectos gerais da dor	17
1.2. Dor nociceptiva.....	19
1.3. Dor inflamatória	19
1.4. Dor funcional	20
1.5. Dor neuropática	20
1.5.1. Mecanismos de desenvolvimento da dor neuropática	23
1.5.2. Farmacoterapia da dor neuropática	28
1.6. Novas estratégias para tratamento da dor neuropática.....	32
1.7. NO e nicorandil	33
1.8. Modelos experimentais para estudo da dor neuropática	37
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVO.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1. Animais experimentais	42
4.2. Drogas, fármacos e reagentes diversos.....	42
4.3. Preparo, dose e via de administração das soluções e suspensões	43
4.3.1. Solução de paclitaxel.....	43
4.3.2. Suspensões de nicorandil, nicotinamida e ácido nicotínico.....	43
4.3.3. Solução de fenobarbital.....	43
4.3.4. Soluções de naltrexona, glibenclamida e ciproheptadina.....	43
4.4. Modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel	44
4.5. Modelo experimental de dor neuropática induzida por constrição do nervo isquiático.....	44
4.6. Avaliação da alodínia mecânica nos diferentes modelos de dor neuropática.....	44

4.7. Tratamentos realizados no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.....	45
4.8. Tratamentos realizados no modelo experimental de constrição do nervo isquiático.....	49
4.9. Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida e ciproheptadina sobre a atividade do nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel	49
4.10. Avaliação da atividade motora.....	50
5. RESULTADOS	53
5.1. Padronização do modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.....	53
5.2. Efeito induzido pelo nicorandil administrado no 7° dia sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	54
5.3. Efeito induzido pelo nicorandil administrado no 14° dia sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em camundongos	57
5.4. Efeito induzido por administrações repetidas de nicorandil no 14°, 15° e 16° dias sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel	60
5.5. Efeito induzido pelo nicorandil sobre a atividade motora no modelo da haste girante.....	62
5.6. Efeito induzido pelo nicorandil ou por doses equimolares de nicotinamida ou ácido nicotínico sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel.....	62
5.7. Efeito induzido pelo nicorandil sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático	63
5.8. Efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida sobre a atividade antialodínica do nicorandil	65
6. DISCUSSÃO	71
6.1. Atividade do nicorandil no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel em camundongos	71

6.2. Ausência da atividade dos metabólitos nicotinamida e ácido nicotínico nos diferentes modelos de dor neuropática	75
6.3. Mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do nicorandil	76
7. CONCLUSÕES	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da dor

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo. Indivíduos que sofrem de anomalias congênitas que os tornam incapazes de detectar estímulos dolorosos não podem sentir uma dor oriunda de um objeto afiado, calor de uma chama, ou mesmo um desconforto associado à lesões internas, como um osso quebrado. Como resultado, eles não desenvolvem comportamentos de proteção adequados contra essas condições, o que pode ser fatal (BASBAUM et al., 2009).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor definiu a dor como "uma experiência desagradável sensorial e emocional associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão" (LOESER & MELZACK, 1999; DELLAROZA et al., 2008). Esta definição inclui três fenômenos: a experiência, que é tanto sensorial quanto emocional; a ligação desta particular experiência a danos nos tecidos; e a antecipação de danos nos tecidos. Por ser uma experiência subjetiva que inclui um componente emocional, a ocorrência da dor só pode ser seguramente determinada quando relatada (COHEN, 2013).

A somatossensação, conhecida como toque, engloba várias submodalidades. Estas incluem: o toque (detecção de estímulos mecânicos leves), propriocepção (detecção de deslocamento mecânico de músculo e articulações), termo-sensação (detecção de frio e calor) e nocicepção (detecção de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos nocivos que dão origem a sensações de dor). Com exceção da sensibilidade química, a nocicepção poderia simplesmente ser considerada uma versão extrema de sensação de toque e temperatura (JULIUS, 2013).

Os estímulos nocivos são inicialmente detectados pelas fibras nervosas sensoriais primárias (nociceptores) que inervam um alvo periférico e transmitem essa informação aos neurônios dentro do corno dorsal da medula espinhal, e daí ao cérebro, através de circuitos neurais ascendentes (JULIUS, 2013). A nocicepção constitui um processo fisiológico e/ou fisiopatológico primário para os sistemas sensoriais somático, visceral e trigeminal. Os campos receptivos especializados para

a dor são denominados nociceptores, que são neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico (SNP) que transmitem sinais nociceptivos. Eles se encontram em populações distintas de gânglios sensoriais. Estes neurônios enviam informações periféricas para as regiões somáticas, viscerais e craniofaciais, e também se conectam à medula espinhal e tronco cerebral, e são os mediadores críticos anatômicos/estruturais da transmissão de sinal sensorial entre o SNP e o sistema nervoso central (SNC) (MICKLE et al., 2016). Os nociceptores podem ser também caracterizados por terminações de fibras nervosas A δ e C e, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação (ROCHA et al., 2007).

As fibras A δ , mielinizadas, e as fibras C, não mielinizadas, possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. Em função da presença da bainha de mielina, as fibras A δ , transmitem o estímulo doloroso de forma rápida, enquanto que as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor (ROCHA et al., 2007).

As características relevantes da dor incluem localização, intensidade e duração. O local da dor permite a determinação da possível causa, porém a localização nem sempre corresponde ao local da lesão ou do processo de doença. Dores relatadas em órgãos profundos, por exemplo, são particularmente mal localizados, uma vez que esses órgãos não têm nociceptores, enquanto o peritônio sobreposto tem inervações sensoriais extensas. A intensidade da dor relatada pelo doente é individual e é a característica mais difícil de avaliar. A duração da dor é um aspecto mensurável que permite a diferenciação entre aguda e crônica. A dor aguda é caracterizada por um período menor e atua como uma advertência defensiva. A dor aguda está ligada a diversas regiões cerebrais como o córtex cingulado anterior, a amígdala, córtex somatossensorial primário e secundário, a ínsula posterior entre outros. A dor crônica discorre em um período maior, não atua como uma advertência defensiva e requer um tratamento multiterapêutico. Pode ser considerada como um estado de doença, ultrapassa o tempo normal de cura se relacionado com uma doença ou lesão, pode surgir de estados psicológicos e não tem nenhum propósito biológico. Neste tipo de dor, o córtex pré-frontal mediano foi identificado como a região que melhor reflete as flutuações espontâneas da dor (ŚWIEBODA et al., 2013; FLOR, 2014).

A dor também pode ser classificada de acordo com a etiologia. Conforme esta abordagem, a dor pode ser dividida nas seguintes modalidades: dor nociceptiva, dor inflamatória, dor funcional e dor neuropática (FIGURA 1) (WOOLF, 2004). Esta classificação será descrita em maiores detalhes a seguir.

1.2. Dor nociceptiva

A dor nociceptiva reflete a capacidade do indivíduo de detectar a presença de estímulos potencialmente prejudiciais (HEHN et al., 2012) e consiste nos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. A dor nociceptiva é, assim, essencial para proteger o organismo de danos teciduais. A via neural importante para a dor nociceptiva pode, de forma simplificada, ser considerada uma cadeia de três neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem que ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem que projeta-se para o córtex cerebral. O primeiro processo da nocicepção é a decodificação de sensações mecânica, térmica e química em impulsos elétricos por terminais nervosos especializados (nociceptores). Os nociceptores estão incluídos nos neurônios de primeira ordem, cuja função é preservar a homeostasia tecidual, assinalando uma injúria potencial ou real. A dor nociceptiva é, portanto, uma sensação fisiológica vital (KLAUMANN et al., 2008; WOOLF, 2004)

1.3. Dor inflamatória

A dor inflamatória resulta da ação de múltiplos mediadores inflamatórios (citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, cininas, proteínas de fase aguda e anticorpos) que sensibilizam ou ativam os nociceptores e, geralmente, está relacionada à inflamação decorrente de uma lesão ou infecção tecidual e pode ter durações variáveis. Diversos estímulos endógenos e exógenos podem causar lesão tecidual provocando a inflamação, que tem como objetivo final a eliminação tanto desses estímulos quanto das consequências da lesão, como células e tecidos necróticos. Logo, a inflamação é uma resposta adaptativa do organismo que visa à restauração da homeostasia (MEDZHITOV, 2008; KIM & DEUTSCHMAN, 2000).

Durante a inflamação, que tem como consequência a dor inflamatória, as concentrações de citocinas inflamatórias como interleucina 1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) se elevam e concentrações de citocinas anti-inflamatórias como interleucina 10 e fator de crescimento transformante beta (TGF- β) diminuem. As citocinas inflamatórias induzem efeitos benéficos, mas quando em excesso, podem contribuir para o desenvolvimento de condições patológicas. As citocinas e quimiocinas inflamatórias podem alterar a resposta ao estímulo doloroso e causar algumas alterações como hiperalgesia, alodínia e edema. A continuação da liberação de citocinas inflamatórias durante as doenças inflamatórias está associada à ativação das células gliais através da barreira hematoencefálica, induzindo dor inflamatória. Como o aumento das concentrações de citocinas inflamatórias e a ativação das vias de sinalização intracelular induzidas por estes fatores são a principal causa do desenvolvimento da dor inflamatória, acredita-se que a inibição da ação destas citocinas pode ser uma estratégia importante visando ao alívio deste tipo de dor (NAZEMIAN et al., 2016).

1.4. Dor funcional

A dor funcional é uma categoria de dor menos compreendida que resulta de um funcionamento e/ou uma reatividade anormal do sistema nervoso cujas causas são desconhecidas. Este tipo de dor não tem função adaptativa e os pacientes não apresentam nenhum déficit neurológico ou anormalidade periférica detectável. Diversas condições têm características que podem colocá-las nesta categoria de dor, por exemplo, a fibromialgia, a síndrome do intestino irritável e a cefaleia do tipo tensional (WOOLF, 2004).

1.5. Dor neuropática

A dor neuropática é uma modalidade de dor crônica associada à lesão ou doenças que afetam o SNC ou o SNP que, diferente das dores nociceptiva e inflamatória, não tem função adaptativa conhecida (JENSEN et al., 2011; WOOLF, 2004). A dor neuropática pode ser definida também como uma dor decorrente de lesão ou disfunção dos nervos e de modo mais amplo, como consequência de lesão ou doença do sistema somestésico. Essa modalidade de dor representa uma síndrome complexa, com mecanismos biológicos pouco esclarecidos, envolvendo teorias inflamatórias e imunes (KRAYCHETE et al., 2008). Além da dor neuropática

manifestar-se por um longo período de tempo, o que a caracteriza como uma modalidade de dor crônica, é uma síndrome debilitante que possui um impacto significativo sobre a qualidade de vida do paciente. A dor neuropática também é caracterizada por uma resposta inadequada às terapias convencionais analgésicas e tem um alto impacto econômico na sociedade (KLAUMANN et al., 2008; LOESER & MELZACK, 1999; HEHN et al., 2012). Pacientes com dor de origem predominantemente neuropática apresentam idade mais avançada e geralmente relatam maior desconforto que pacientes com outros tipos de dor crônica. Além disso, pacientes com dor neuropática apresentam piores índices de qualidade de vida e estado geral de saúde (RESENDE et al., 2010). Comorbidades como alterações do sono, depressão e ansiedade são comuns em pacientes com dor neuropática, levando a discussões não resolvidas sobre se a dor causa alterações no humor e no sono ou se os indivíduos com distúrbios do humor e do sono apresentam maior risco de desenvolver essa modalidade de dor (HEHN et al., 2012).

Os pacientes com dor neuropática apresentam queixas múltiplas e complexas e geralmente têm dificuldade para descrever o desconforto. A maioria dos pacientes tenta descrever seus sintomas mediante o recurso da analogia “é como se fosse um...” (SCHESTATSKY, 2008).

O primeiro passo no diagnóstico clínico de dor neuropática é documentar a doença ou lesão que se presume ter causado e seu local anatômico (HEHN et al., 2012). Achados anormais no exame físico neurológico sensitivo em um paciente com dor sugerem dor neuropática como diagnóstico. Outro aspecto relevante é a avaliação do tônus muscular e dos reflexos miotáticos profundos e superficiais que vão auxiliar no diagnóstico topográfico da dor (dor neuropática periférica ou central). Com o objetivo de dar sentido aos sinais e sintomas neuropáticos, é útil dividir as manifestações da dor neuropática em sintomas negativos, positivos e autonômicos (SCHESTATSKY, 2008). Os sintomas negativos e positivos geralmente podem coexistir. Os sintomas negativos incluem déficits somatossensoriais, como tátil, da vibração e sensação termoalgésica. Estes sintomas são desconfortáveis, mas não dolorosos. A causa dos sintomas negativos nas neuropatias periféricas é o dano direto aos neurônios sensoriais primários. Isto pode produzir morte celular ou comprometimento da informação sensorial da transdução (conversão de um estímulo nocivo térmico, mecânico ou químico em atividade elétrica nos

nociceptores) devido à atrofia terminal ou condução (passagem de potenciais de ação do terminal periférico ao longo dos axônios até o terminal central dos nociceptores no SNC), à perda de axônios periféricos ou transmissão (transferência sináptica e a modulação da entrada de um neurônio para outro) ou à perda de terminais centrais. Já os sintomas positivos da dor neuropática podem apresentar-se de forma espontânea ou evocada, em várias combinações. Os sintomas positivos incluem alodínia mecânica, térmica e por movimento; hiperalgesia; hiperpatia e hiperatividade autonômica (NICKEL et al., 2012; SCHESTATSKY, 2008; HEHN et al., 2012; WOOLF, 2004).

A dor neuropática pode ter sua etiologia em diferentes doenças e condições como diabetes mellitus, herpes zoster, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), deficiência de vitamina B, abuso de álcool, intervenções médicas como quimioterapia e cirurgia, bem como lesões como acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, isquemia vascular, trauma medular e avulsão traumática de plexo braquial. Como consequência, pode levar ao desenvolvimento de diferentes síndromes neuropáticas, como neuropatia diabética, neuralgia pós-herpética, neuropatia por HIV, neuropatia induzida por deficiência de vitamina, neuropatias induzidas por álcool, neuropatia induzida por quimioterápico, lesão do nervo traumático, compressão da raiz dorsal, entre outros. A prevalência de dor neuropática provavelmente aumentará, devido ao aumento da sobrevivência de pacientes com doenças crônicas associadas a este tipo de dor e ao envelhecimento populacional (O'CONNOR & DWORKIN, 2009; HEHN et al., 2012; SCHESTATSKY, 2008).

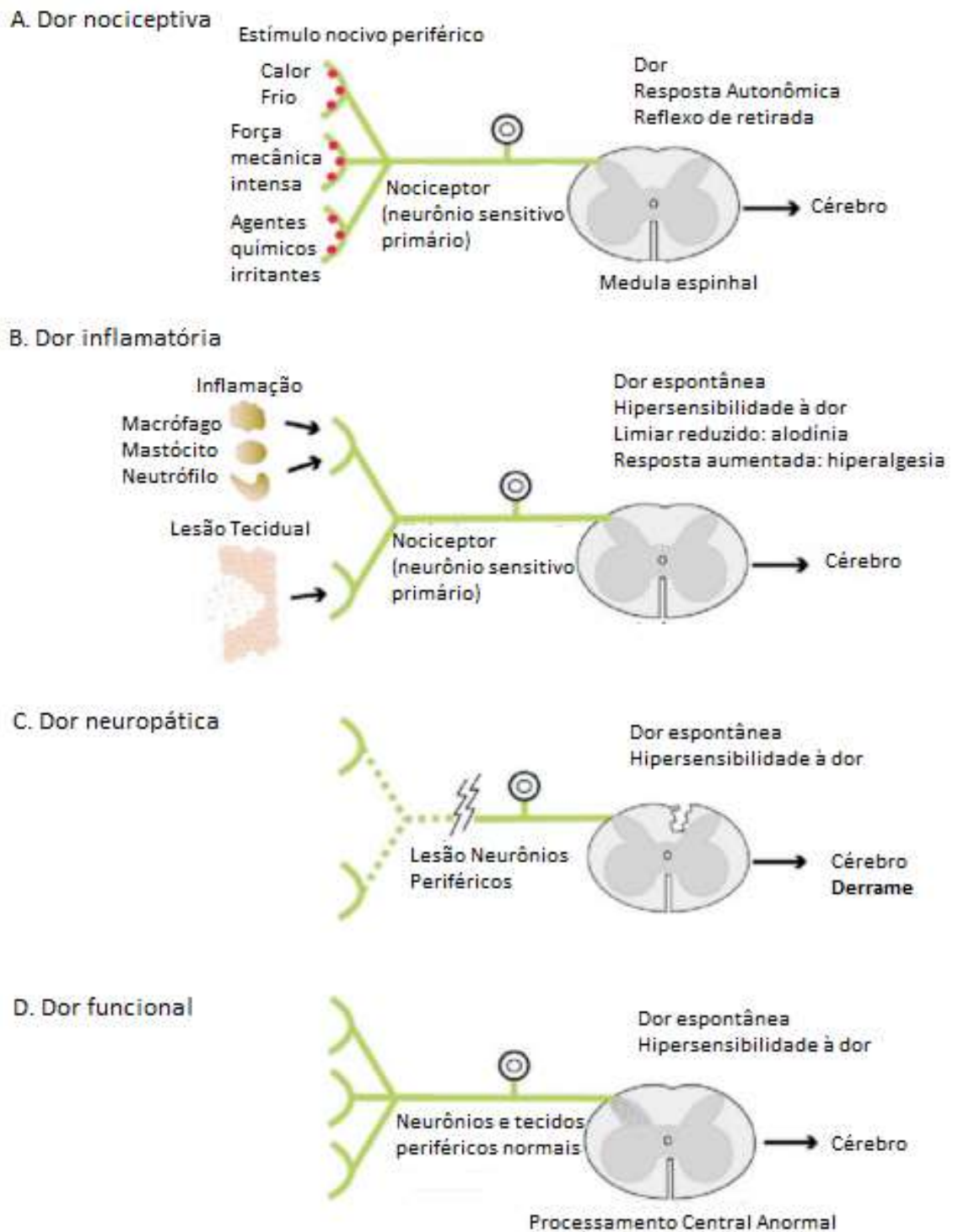


Figura 1 - Modalidades de dor de acordo com a etiologia. Fonte: Adaptado de WOOLF, 2004.

1.5.1. Mecanismos de desenvolvimento da dor neuropática

A dor neuropática é muito heterogênea, com padrões múltiplos de apresentação refletindo diversas combinações de fatores etiológicos, genéticos e ambientais, e

especificamente, os processos neurobiológicos envolvidos. Devido à sua diversidade mecanicista e manifestações diferentes, estes processos produzem um perfil complexo ou uma constelação de sintomas e sinais sensoriais positivos e negativos (HEHN et al., 2012).

A síndrome neuropática é o resultado final de uma doença iniciadora combinada com fatores individuais contribuintes, tais como genótipos e fatores ambientais como dieta e estilo de vida, os quais levam a combinações individuais de mecanismos fisiopatológicos, manifestando-se como um fenótipo de dor neuropática individual (FIGURA 2) (HEHN et al., 2012).



Figura 2 - Da etiologia à dor neuropática. Fonte: Modificado de HEHN et al., 2012.

Sabe-se que diversos mecanismos podem levar ao desenvolvimento da dor neuropática. Um mesmo sintoma pode ser gerado por diversos mecanismos, enquanto um mecanismo pode induzir diversos sintomas. Atividade ectópica de neurônios, sensibilização periférica e central e neuroinflamação são os principais eventos que levam ao desenvolvimento da dor neuropática (BARON et al., 2010; HEHN et al., 2012; SCHOLZ & WOOLF, 2002).

A sensibilização de nociceptores ou sensibilização periférica (FIGURA 3), caracterizada pela diminuição do limiar para ocorrência do potencial de ação, é um importante mecanismo, uma vez que contribui para condições como neuralgia pós-herpética e síndrome de dor regional complexa. A percepção de estímulos nocivos resulta da ativação dos nociceptores por substâncias exógenas ou endógenas (mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas e outros derivados do ácido araquidônico; neurotransmissores como aminoácidos excitatórios, neurocininas, serotonina, noradrenalina, histamina; e fatores de crescimento como o

fator de crescimento nervoso (NGF). Os metabólitos lipídicos como o ácido lisofosfatídico, que é liberado após lesão tecidual, também têm um papel na dor neuropática. Sabe-se que uma lesão das vias sensoriais é necessária para o desenvolvimento de dor neuropática, e após dano axonal de um nervo periférico ocorre degeneração Walleriana. O axônio e a bainha de mielina são degradados e os macrófagos, assim como outros tipos de células imunes (neutrófilos, células T), infiltram-se no local. Ocorre liberação de vários mediadores inflamatórios como: interleucinas, TNF α , bradicinina, prostaglandinas, bem como fatores de crescimento (NGF). Estas alterações promovem hiperalgesia e alodínia. A sensibilização de nociceptores é mediada por vários canais iônicos, entre os quais aqueles da família de receptores de potenciais transientes (TRP). Um membro proeminente é o TRPV1, que é ativado pelo calor e pela capsaicina e altamente expresso nas fibras A δ e C. Além disso, na dor neuropática a sinalização intracelular é alterada. Os segundos mensageiros, como o AMPc, as proteínas quinases (PKA e PKB, proteína quinase ativada por mitógenos) e as vias de sinalização de óxido nítrico (NO) explicam as mudanças funcionais e estruturais que perpetuam a experiência da dor. Por exemplo, a bradicinina e a prostaglandina E2 ativam a PKA e PKC e exacerbam funções mediadas pelo TRPV1. Além disso, a expressão do TRPV1 é aumentada em modelos de dor neuropática (NICKEL et al., 2012; WOOLF, 2004; HENH et al., 2012; BARON et al., 2010).

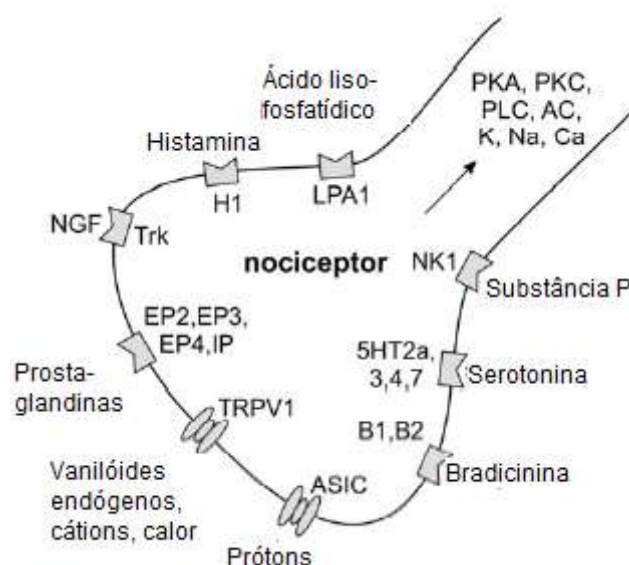


Figura 3 - Sensibilização de um nociceptor. Fonte: Modificado de NICKEL et al., 2012.

Nas síndromes de dor neuropática, a excitabilidade ectópica anormal de neurônios aferentes leva a sintomas positivos. A detecção de dor espontânea contínua e dor do tipo paroxística na ausência de qualquer estímulo externo é causada pela geração de impulsos ectópicos nas vias nociceptivas. Aparentemente, esses sintomas são gerados pelos canais para sódio, que são diferencialmente expressos e distribuídos e anormalmente ativos em modelos de dor neuropática. Os neurônios sensoriais contêm dois grupos de canais para sódio sensíveis a voltagem: os canais de ação rápida sensíveis à tetrodotoxina (TTX-S) e os canais de ação retardada resistentes à tetrodotoxina (TTX-R). Estes últimos são detectados apenas em nociceptores e estão envolvidos em estados de dor associada a diferentes condições patológicas. Em condições fisiológicas, a ativação de fibras nociceptivas A δ e C indicam dano potencial ao tecido, que é refletido nos altos limiares dos nociceptores para estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Estas condições mudam drasticamente nos estados de dor neuropática. Após a lesão nervosa periférica, a atividade espontânea é evidente tanto em nervos lesionados quanto em nervos vizinhos não lesionados. Ocorre aumento da concentração de canais para sódio de qualquer tipo no local da lesão e em todo o axônio. Até o momento, foram identificados nove subtipos de canais para sódio ativados por voltagem (Na_v1.1 a Na_v1.9). Os níveis crescentes de RNA mensageiros para os canais para sódio sensíveis à voltagem parecem correlacionar-se com a atividade ectópica e o aumento da expressão dos canais para sódio em fibras lesionadas e intactas, o que leva à diminuição do limiar de potencial de ação até à ocorrência da atividade ectópica. Além de canais para sódio sensíveis à voltagem, vários outros canais iônicos provavelmente sofrem alterações após uma lesão de nervos, como canais para potássio, o que também pode contribuir para mudanças na excitabilidade da membrana dos nociceptores. A lesão de nervos também induz a regulação positiva de várias proteínas receptoras, tais como o TRPV1, já citada anteriormente. Sabe-se que o TRPV1 é fisiologicamente ativado por calor nocivo a cerca de 41°C. Após uma lesão nervosa, o TRPV1 é regulado negativamente em fibras nervosas lesionadas, mas é expresso positivamente em fibras C não lesionadas. Esta nova expressão de TRPV1 e a sensibilização adicional ao calor por transdução de sinal intracelular podem levar a atividade nervosa espontânea induzida pela temperatura normal do corpo, se o limiar de TRPV1 for reduzido para abaixo de 38 °C. Clinicamente, os pacientes com tais mecanismos de dor subjacentes também podem ser

caracterizados pela presença de hiperalgesia ao calor, além da dor associada à sensação de queimação (BARON et al., 2010; NICKEL et al., 2012).

A sensibilização central é a base para entender como neurônios não nociceptivos podem passar a induzir dor e como a hipersensibilidade pode se espalhar para áreas distantes da lesão inicial (hiperalgesia e alodínia secundárias). Alodínia secundária e hiperalgesia na área adjacente ao território de inervação dos nervos lesionados requerem envolvimento do SNC. A sensibilização central pode se desenvolver como consequência da atividade ectópica em nociceptores e, não necessariamente danos estruturais do SNC podem estar envolvidos. As descargas em curso de fibras periféricas que liberam aminoácidos excitatórios e neuropeptídeos no corno dorsal da medula espinhal levam a alterações pós-sinápticas de neurônios nociceptivos de segunda ordem, como a fosforilação de receptores NMDA (N-metil D-aspartato) e AMPA (Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) ou a expressão de canais para sódio sensíveis a voltagem. Estas alterações induzem a hiperexcitabilidade neuronal que permite que as fibras aferentes de A β e A δ de baixo limiar, ativadas por estímulo mecânico, ativem neurônios nociceptivos de segunda ordem. Isto significa que os estímulos táteis normalmente inócuos tornam-se dolorosos. Mecanismos semelhantes podem ocorrer não somente na medula espinhal, mas também nos níveis supraespinhais, como tem sido relatado em pacientes com dor central. Uma vez iniciada, a sensibilização central pode se tornar autônoma, não dependendo mais da atividade dos nociceptores. Assim, a sensibilização central é responsável por uma amplificação da dor, com diminuição de seu limiar, uma expansão de sua extensão espacial e mudanças nas suas características sensoriais (BARON et al., 2010; HEHN et al., 2012; VALLEJO et al., 2010; SCHOLZ & WOOLF, 2002; WOOLF, 2004).

Outro mecanismo característico da dor neuropática é a neuroinflamação. Após lesões em nervos periféricos, ocorre uma infiltração maciça de macrófagos, tanto no local da lesão quanto na medula espinhal, que liberam vários mediadores inflamatórios. Esses mediadores irão ativar tanto células do sistema imune quanto células microgliais. Depois de ativadas, as células microgliais passam a liberar citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, que, além de contribuir para o desenvolvimento da dor, recrutam mais células da micróglia e ativam astrócitos.

Essas células da glia têm um papel fundamental na manutenção da dor neuropática e da hiperalgesia, pois alteram as características de polarização de neurônios, modulando, assim, a transmissão dos estímulos dolorosos ao SNC (WOOLF, 2004; HEHN et al., 2012)

1.5.2. Farmacoterapia da dor neuropática

O manejo farmacoterapêutico da dor neuropática ainda é um desafio porque muitos pacientes não experimentam alívio suficiente (BARON et al., 2010). Estima-se que apenas 25% dos pacientes com dor neuropática apresentam um alívio superior a 50% da dor com o uso dos fármacos disponíveis. Essa dificuldade se deve, provavelmente, aos diversos mecanismos que podem levar ao desenvolvimento da dor neuropática, além dos fatores emocionais que geralmente acompanham as dores crônicas e das reações adversas causadas pelos fármacos (BRITO, 2014).

Além do controle de sintomas, o gerenciamento de pacientes com dor neuropática requer reavaliação periódica para descartar outras condições médicas subjacentes tratáveis. A educação do paciente, incluindo as informações sobre dor neuropática, o plano de tratamento e as possíveis reações adversas induzidas pelos medicamentos, também é muito útil, pois aumenta a adesão ao tratamento. Informar, também, ao paciente as limitações dos tratamentos atualmente disponíveis evita expectativas irrealistas sobre eficácia e tolerabilidade, uma vez que as terapias atuais muitas vezes não são curativas e a dor residual, mesmo durante o tratamento, é comum (GILRON et al., 2015).

Uma abordagem gradual é recomendada, começando com tratamentos mais seguros, menos dispendiosos e menos invasivos. No entanto, em muitos casos, vários desafios e complexidades de casos individuais podem indicar a necessidade de tratamentos mais intensivos, bem como uma estratégia multimodal e multidisciplinar de manejo da dor, incluindo regimes de tratamento farmacológico e não-farmacológico, como a terapia cognitivo-comportamental, física e ocupacional. Isto inclui, por exemplo, o encaminhamento e o tratamento concomitante por um fisioterapeuta, em casos nos quais a dor interfere substancialmente no trabalho e outras atividades diárias. Além disso, a avaliação precoce da coexistência de depressão, ansiedade e/ou transtornos de abuso de substâncias pode facilitar o encaminhamento precoce para um psicólogo, psiquiatra e/ou cuidado terciário no

manejo da dor. As respostas dos pacientes às intervenções farmacoterapêuticas mais tradicionais devem ser cuidadosamente avaliadas e documentadas para ajudar a orientar as próximas etapas do tratamento (GILRON et al., 2015; BARON et al., 2010).

Os pacientes costumam responder de forma inadequada aos analgésicos comuns, sendo os anticonvulsivantes (gabapentina e pregabalina), os antidepressivos tricíclicos (nortriptilina e desipramina), os inibidores da recaptção de serotonina-norepinefrina (duloxetina e venlafaxina) e os anestésicos locais (lidocaína) os principais fármacos que promovem alívio da dor neuropática. O uso de morfina ou outros opioides frequentemente promove resposta favorável, sendo necessárias doses elevadas, o que aumenta o risco de ocorrência de reações adversas (BRITO, 2014; SCHESTATSKY, 2008; OLIVEIRA & GABBAI, 1998).

Embora vários anticonvulsivantes avaliados visando ao alívio da dor neuropática, apenas alguns antagonistas de canais para cálcio, gabapentina e pregabalina são atualmente recomendados como tratamentos de primeira linha (GILRON et al., 2015). Os anticonvulsivantes atuam por meio de sua atividade anestésica local com estabilização da membrana neuronal, diminuição da transmissão sináptica e supressão da atividade espontânea que pode ocorrer no neurônio aferente primário e gânglio da raiz dorsal. Esses fármacos são indicados principalmente em situações nas quais lesões parciais ou totais de nervos causam desequilíbrio entre os impulsos aferentes e os mecanismos de modulação (OLIVEIRA & GABBAI, 1998). A gabapentina e a pregabalina se ligam aos canais para cálcio nos terminais centrais dos nociceptores, levando à diminuição da liberação de neurotransmissores. Ambas os fármacos têm sido amplamente estudados em síndromes de dor periférica, embora a pregabalina tenha sido o foco da maioria dos estudos em síndromes de dor neuropática central (BARON et al., 2010). Estes fármacos podem induzir vertigem e sedação relacionadas com a dose, que podem ser atenuadas com o uso inicial de doses menores (O'CONNOR & DWORKIN, 2009).

Os antidepressivos tricíclicos inibem a recaptção de monoaminas em sistemas inibitórios descendentes por meio da ativação de diferentes mecanismos. Embora a analgesia induzida por esses fármacos seja independente da atividade antidepressiva, essa atividade pode ser benéfica porque a depressão é uma

comorbidade frequente em pacientes com dor neuropática crônica. Esta classe de antidepressivos induz várias reações adversas, principalmente devido às suas propriedades anticolinérgicas. Os inibidores seletivos da recaptação de norepinefrina e serotonina (duloxetina e venlafaxina) são eficientes em polineuropatias dolorosas (BARON et al., 2010). Existem evidências de que fármacos que bloqueiam canais para sódio são eficazes no tratamento de pacientes com dor neuropática. Os antidepressivos tricíclicos induzem analgesia pois bloqueiam os canais para sódio, aumentam a disponibilidade supraespinal de norepinefrina e o controle inibitório bulbo espinal descendente, ativam receptores opioides e inibem o receptor NMDA. Diferentes antidepressivos tricíclicos inibem $Na_v1.7$ em concentrações plasmáticas terapêuticas, enquanto que os inibidores seletivos da recaptação de serotonina não apresentam esta atividade. Isto pode explicar por que esse último grupo de fármacos é menos eficaz no tratamento de pacientes com dor neuropática. Os antidepressivos reduzem a dor crônica em pacientes deprimidos e não-deprimidos, sugerindo mecanismos analgésicos independentes (NICKEL et al., 2012; GILRON et al., 2015).

A lidocaína alivia a dor através de bloqueio não específico de canais para sódio em neurônios sensoriais, sem causar dormência da pele tratada e de forma bastante segura. As reações adversas mais comuns são reações locais leves, como eritema e erupção cutânea, e as reações adversas sistêmicas são incomuns. A lidocaína tópica é mais apropriada em dor neuropática periférica localizada e é improvável que tenha eficácia em pacientes com dor neuropática central (BARON et al., 2010; O'CONNOR & DWORKIN, 2009; ATTAL et al., 2010).

Os analgésicos opioides, como a morfina e o tramadol, são agonistas dos receptores opioides pré-sinápticos e pós-sinápticos. A eficácia desses fármacos foi relatada em vários ensaios clínicos randomizados em diferentes distúrbios da dor neuropática periférica e central. Os opioides têm uma eficácia analgésica comparável à dos antidepressivos tricíclicos. As reações adversas mais comuns induzidas pelos opioides incluem constipação, sedação, náuseas e vômitos. Relatórios de consenso recentes recomendam opioides como terapia de segunda linha ou terceira linha para pacientes com dor neuropática, não só devido à eficácia e à segurança, mas também devido a preocupações bem reconhecidas sobre o abuso de opioides, como alterações imunológicas, dependência física e uso indevido ou abuso (BARON et al., 2010; GILRON et al., 2015). Os opioides geralmente devem ser reservados para

pacientes que não respondem aos medicamentos de primeira linha, recomendação que é consistente com as diretrizes publicadas para o uso de opioides na dor crônica não associada ao câncer. Os opioides, no entanto, representam a única classe de fármacos que promovem alívio imediato da dor neuropática. Por esta razão, os opioides podem ser considerados para uso em primeira linha em certas situações clínicas, como por exemplo, para pacientes com dor neuropática aguda e para o alívio de dor neuropática em pacientes com câncer (O'CONNOR & DWORKIN, 2009).

Na prática clínica, muitas vezes é necessária uma combinação de dois ou mais fármacos para conseguir um alívio satisfatório da dor, embora haja poucos ensaios realizados para apoiar esta observação clínica (BARON et al., 2010).

Os pacientes com dor neuropática, muitas vezes, não respondem adequadamente aos tratamentos farmacológicos usados isoladamente ou em combinação com tratamentos não-farmacológicos e sua dor é, portanto, chamada de refratária. Antes que os pacientes continuem a rotação farmacológica interminável que não produz o alívio desejado da dor ou induz reações adversas intoleráveis, outras estratégias devem ser consideradas. As técnicas de tratamento intervencional da dor incluem bloqueio neural, estimulação da medula espinhal, injeção intratecal de medicamentos e intervenções neurocirúrgicas. Uma recente revisão sistemática avaliou o efeito induzido por tratamentos intervencionistas em muitas síndromes de dor neuropática e concluiu que as evidências para a eficácia do manejo intervencionista da dor neuropática são limitadas. Não mais de 40% a 60% dos pacientes obtém alívio duradouro da dor, sendo que o alívio é parcial. Entretanto, deve-se reconhecer que a falta relativa de evidência de eficácia não sugere necessariamente evidência de falta de eficácia e, portanto, o manejo intervencionista racional de pacientes com dor neuropática crônica deve ser considerada como um componente integral de uma abordagem mais abrangente (GILRON et al., 2015). A estimulação elétrica transcutânea é comumente utilizada como terapia não-invasiva e, embora o nível de evidência seja baixo, a relação risco/benefício é favorável e, portanto, essa estimulação é uma opção terapêutica em pacientes com dor neuropática (BARON et al., 2010). Tem sido proposto, também, o uso de estimulação magnética transcraniana no tratamento de pacientes com alguns tipos de dor neuropática, visando à modulação dos sintomas dolorosos por meio da

reorganização cortical induzida (SCHESTATSKY, 2008). Inicialmente utilizada para a dor talâmica, tem sido avaliada em pacientes com síndromes de dor resistentes ao tratamento, tais como dor de membro fantasma e neuralgia pós-herpética, entre outras (HONEY et al., 2016).

1.6. Novas estratégias para tratamento da dor neuropática

O processo de descoberta de drogas geralmente começa com a identificação de um composto, que tem potencial para se tornar um fármaco ativo. Esse composto pode então entrar em um processo muito demorado e dispendioso para conseguir uma validação pré-clínica da eficácia terapêutica. São necessários estudos de farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade antes da aplicação clínica. Devido aos elevados custos de estudos pré-clínicos, bem como avaliação clínica ao longo de muitos anos, a introdução de novos medicamentos para uma determinada doença tornou-se um esforço desafiador (MUDDULURU et al., 2016).

Diante disso, o conceito de reposicionamento de fármacos está ganhando muita atenção. Uma definição simples disso é investigar novos usos para os medicamentos existentes já aprovados. Existem vários exemplos na literatura médica recente que sustentam este conceito. Como exemplos, estão o minoxidil (inicialmente desenvolvido como tratamento para hipertensão, mas posteriormente utilizado para tratar a queda de cabelo), sildenafil (inicialmente utilizado para tratamento de hipertensão, e atualmente prescrito para disfunção erétil) e talidomida (sedativo, analgésico e antiemético reposicionada para o tratamento de eritema nodoso leproso e mieloma múltiplo) (PALOMINO & MARTIN, 2013).

As análises relativas aos esforços científicos, clínicos e financeiros e ao respectivo estabelecimento de um novo fármaco para aplicação clínica de rotina revelaram uma diminuição significativa no número de fármacos introduzidos na clínica. O tempo médio para o desenvolvimento de um novo fármaco também aumentou consideravelmente ao longo do tempo. Durante a década de 1990, o tempo médio necessário para o lançamento no mercado era de 9,7 anos. Isto aumentou para quase 14 anos a partir de 2000, e continua aumentando. O Centro Tufts para o Estudo de Desenvolvimento de Medicamentos afirmou que os custos para o lançamento no mercado de um novo medicamento em 2014 aumentou 1,7 vezes comparado aos custos exigidos em 2003 (MUDDULURU et al., 2016). Para tornar a

situação ainda mais preocupante, a taxa de insucesso é extremamente elevada, de forma que pouquíssimos candidatos a fármacos avançam à fase de ensaios clínicos e um número menor ainda é aprovado pelas agências regulatórias para uso clínico. Uma das alternativas encontradas e que tem sido estimulada é a identificação de novas funções para fármacos conhecidos (reposicionamento de fármacos). A principal vantagem dessa abordagem é que fármacos que já estão em uso clínico geralmente possuem características farmacocinéticas e perfil de segurança bem estabelecidos. A eliminação da maior parte das avaliações toxicológicas e farmacocinéticas pode reduzir em até 40% o custo para obtenção da aprovação do novo uso (CHONG & SULLIVAN, 2007).

Apesar dos grandes avanços em relação aos mecanismos que levam à dor neuropática, o desenvolvimento de fármacos eficientes para o seu alívio ainda não é bem sucedido. A farmacoterapia continua sendo a principal opção terapêutica para tratar pacientes com dor neuropática. Desta forma, a investigação de fármacos conhecidos e com perfil de segurança já estabelecido se torna promissora (BRITO, 2014).

1.7. NO e nicorandil

O NO é uma molécula gasosa simples, normalmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de radical livre que a torna um agente químico altamente reativo. Há muito tempo esta molécula foi conhecida e estudada pelos químicos por se tratar de um gás poluente atmosférico, mas recentemente ganhou grande importância fisiológica. O NO é responsável pela sinalização celular nos sistemas cardiovascular e nervoso e efector da citotoxicidade no sistema imune, além de um dos mediadores da inflamação (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000; MICHEL, 2006).

A síntese do NO é o resultado da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta síntese envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina gerando a N^G-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio e, provavelmente, envolve a enzima NO sintase. A segunda etapa consiste na conversão da NHA em NO e citrulina (FIGURA 4). O NO produzido ativa a guanilato ciclase (GC) solúvel, aumentando o conteúdo de GMPc (monofosfato cíclico de

guanosina) intracelular (FIGURA 5). Diversas células utilizam a arginina para sintetizar o NO. Nas células do endotélio vascular, o NO produzido resulta no relaxamento das células da musculatura lisa vascular. No cérebro, o NO participa do aprendizado e da memória. Esta molécula apresenta atividade também no trato gastrointestinal, trato respiratório, no sistema reprodutor e circulatório. Adicionalmente, há demonstração clara de que o NO tem papel importante no processamento nociceptivo no SNC (DUSSE et al., 2003; CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; MICHEL, 2006).

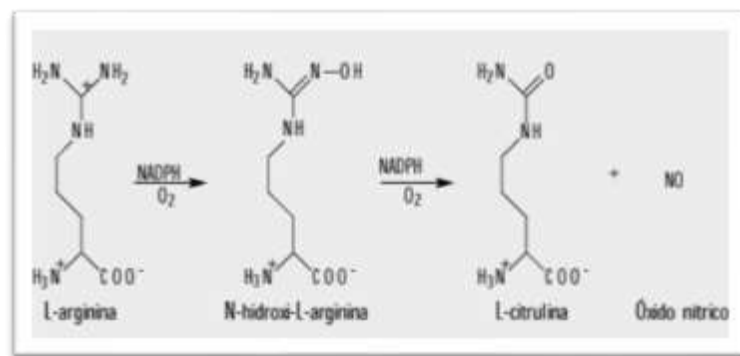


Figura 4 - Síntese do óxido nítrico.

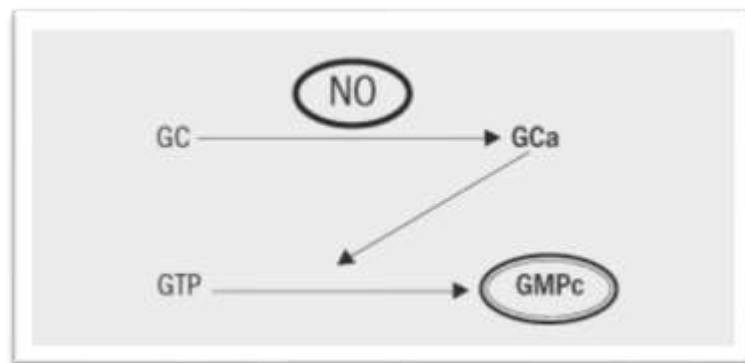


Figura 5 – Processo de ativação do GMPc pelo NO. GC = guanilato ciclase; GCa = guanilato ciclase ativada.

O NO contribui para o desenvolvimento de manifestações da resposta inflamatória, por promover a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, a produção de prostaglandinas inflamatórias e a sensibilização de nociceptores (MONCADA et al., 1991). Embora tenha um papel conhecido para o desenvolvimento da resposta inflamatória, diversos autores já demonstraram a atividade antinociceptiva de drogas

doadoras de NO em inúmeros modelos experimentais de dor e inflamação. Rocha e colaboradores, por exemplo, demonstraram efeito analgésico do nitroprussiato de sódio (doador de NO) em um modelo de periartrite (ROCHA et al. 2003).

O NO tem aplicações terapêuticas diretas (inalação do gás) ou indiretas (administração de moléculas doadoras de NO) (MICHEL, 2006). A partir de descobertas sobre as funções biológicas do NO, foram feitas investigações sobre as atividades de fármacos em uso clínico, acoplado a grupos doadores de NO. O nicorandil [N-(2-hidroxietil) nitrato de nicotinamida] (FIGURA 6) tem uma estrutura química resultante da combinação de um nitrato orgânico à molécula da nicotinamida, e é um doador de NO. Este fármaco foi sintetizado em 1976 e tem sido comercializado desde 1984 no Japão e outros países para o tratamento e prevenção de angina pectoris. O nicorandil apresenta um mecanismo de ação duplo. Atua como vasodilatador relaxando os músculos vasculares lisos através do aumento de GMPc por meio da liberação de NO. Entretanto, este efeito não contribui significativamente para a cardioproteção. Outro efeito mais importante é que, em mitocôndrias cardíacas, o nicorandil ativa os canais para K^+ sensíveis a ATP, exercendo um efeito cardioprotetor direto. O composto N - (2-hidroxietil) - nicotinamida (FIGURA 6), o metabólito principal do nicorandil, é responsável por mediar este último efeito citado. Além disso, a nicotinamida aumenta os efeitos vasculares endógenos de vasodilatadores, tais como a adenosina e adrenomedulina. A nicotinamida, de forma semelhante ao nicorandil, induz vasodilatação, mas a sua eficácia é muito mais baixa do que a do composto de origem. Como NO e canais para K^+ sensíveis a ATP são importantes moléculas de mediação de muitas outras ações biológicas, incluindo a inflamação e nocicepção, não seria surpreendente identificar novas atividades do nicorandil além daquelas que envolvem o sistema cardiovascular (CARREIRA et al., 2007; CÉSAR et al., 2014; PISANO et al., 2016).

O nicorandil possui perfil farmacocinético relativamente simples. A dose recomendada varia de 10 a 20 mg duas vezes por dia até 30 mg duas vezes ao dia. O fármaco é absorvido 30-45 minutos após a ingestão e praticamente não sofre metabolismo de primeira passagem hepática, portanto, apresenta alta biodisponibilidade. A ligação à albumina e proteína plasmática é fraca e a maior parte do fármaco circula livremente. Um estado estacionário é conseguido no quarto dia e administrações repetidas causam acúmulo de nicorandil e seus metabólitos

(com pouco efeito sobre o sistema cardiovascular). As concentrações plasmáticas máximas são atingidas dentro de 60 minutos após a ingestão oral e são diretamente proporcionais à dosagem. O metabolismo ocorre pela desnitração da molécula de nicorandil na via da nicotinamida. As duas principais biotransformações do nicorandil são a desnitração, conduzindo à N - (2-hidroxi) nicotinamida inativa, e a redução da cadeia alquila, conduzindo ao ácido nicotínico (FIGURA 6) (PISANO et al., 2016). Cerca de 60% dos metabólitos de nicorandil são eliminados na urina até 24 horas após a administração. Apenas 1% do fármaco é eliminado na urina na sua forma inalterada e a excreção fecal representa menos que 2%. A depuração renal inicial foi estimada em 10 mL/min, embora pareça existir uma segunda fase de distribuição, com baixos níveis plasmáticos após 8 horas, possivelmente causada por uma liberação lenta dos tecidos vasculares (FRYDMAN et al., 1989; SIMPSON & WELLINGTON, 2004; PISANO et al., 2016). Parâmetros como idade, doença renal ou interferência de enzimas metabolizadoras hepáticas do fármaco não parecem afetar os parâmetros farmacocinéticos. De fato, quando o nicorandil é administrado concomitantemente com um inibidor (por exemplo, cimetidina) ou um indutor (por exemplo, rifampicina) de oxidase microssomal hepática, o perfil farmacocinético do nicorandil permanece inalterado. Apesar da extensão da absorção em pacientes com função hepática deficiente ter sido inferior e a meia-vida de eliminação maior, comparadas àquelas observadas em pacientes com função hepática normal, a relevância clínica não é significativa e ajustes da dose são considerados desnecessários (PISANO et al., 2016; MARKHAM et al., 2000).

As reações adversas induzidas pelo nicorandil são, na grande maioria, de baixa gravidade, sendo que a cefaleia é a reação mais frequentemente relatada, atingindo 30% dos pacientes, nos primeiros dias de tratamento, mas pode ser minimizada iniciando-se o tratamento com doses menores. Outras reações adversas ocorrem em menos de 5% dos pacientes, incluindo manifestações gastrointestinais, fadiga, mal-estar e tonturas (EGRED, 2007). Rubor e hipotensão postural também são relatados devido às suas propriedades vasodilatadoras (ARONSON, 2006).

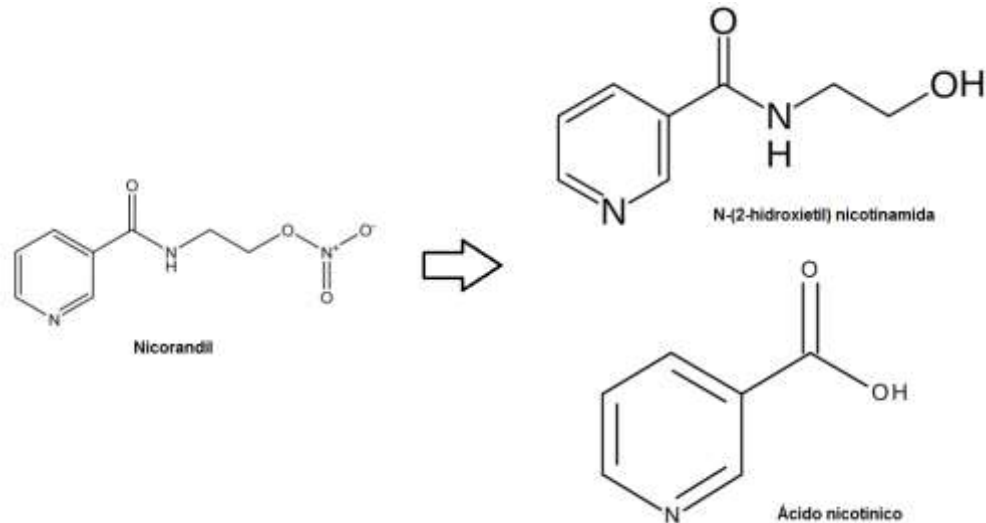


Figura 6 - Biotransformações do nicorandil: desnitração conduzindo à N- (2-hidroxietil) nicotinamida inativa, e a redução da cadeia alquila, conduzindo ao ácido nicotínico.

Embora a investigação dos efeitos induzidos por nicorandil em modelos experimentais de dor ainda seja muito preliminar, há justificativa para tal. Muitos compostos que liberam NO e ativam canais para K^+ sensíveis a ATP, e também a nicotinamida, um metabólito do nicorandil, exibem atividades em diferentes modelos experimentais de dor. Neste contexto, foi demonstrado que a administração sistêmica de nicorandil inibe a resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos. Como já foi demonstrado por Godin et al. (2011), que a nicotinamida é capaz de inibir a primeira e a segunda fase do mesmo modelo de nocicepção, mas em doses bem maiores, fica claro que o acoplamento de um grupo doador de NO à nicotinamida resulta em uma molécula mais potente nesse modelo (CÉSAR et al., 2014; DUTRA et al., 2013).

1.8. Modelos experimentais para estudo da dor neuropática

A maioria dos modelos experimentais para estudo da dor neuropática descritos na literatura foi realizada em ratos e se desenvolveu a partir de lesões periféricas traumáticas, metabólicas ou tóxicas. São eles: ligadura do nervo espinhal – um ou mais nervos espinhais que vão para a pata são apertados por laço e cortados; ligadura isquiática parcial – parte do nervo isquiático é apertada por laço; lesão constritiva crônica – inclui a colocação de quatro ligaduras apertadas com fio cromado no nervo isquiático; lesão limitada do nervo – são cortados os nervos

fibular e tibial posterior e poupado o sural. Essas técnicas provocam alterações comportamentais de longa duração. Outros métodos incluem a injeção de estreptozocina para mimetizar neuropatia diabética ou de paclitaxel e vincristina para mimetizar neuropatia induzida por quimioterapia. Os modelos para dor central utilizam a contusão (trauma usando a força do impacto com deslocamento tissular), ou lesões isquêmicas por compressão lenta através de pinçamento ou da insuflação com balonetes. Métodos citotóxicos usam a injeção de análogos de glutamato (cainato) ou de substâncias que permitem a lesão de locais específicos da substância cinzenta. Estas técnicas descritas visam promover hiperalgesia mecânica e térmica (KRAYCHETE et al., 2008).

O paclitaxel é uma das drogas antineoplásicas mais eficazes para o tratamento de tumores sólidos. Esse fármaco pode induzir duas reações adversas graves: a mielossupressão e a neurotoxicidade periférica. A administração de paclitaxel em ratos, durante quatro dias alternados, induz hiperalgesia térmica e alodínia mecânica. A utilização deste modelo é útil para buscar novas estratégias farmacológicas para prevenir o desenvolvimento de dor neuropática induzida por paclitaxel ou outros antineoplásicos em humanos. Isso levaria a diminuição do sofrimento dos pacientes que precisam receber tratamento quimioterápico, além de poder aumentar a efetividade da quimioterapia, por permitir a administração de maiores doses do paclitaxel (RIGO et al., 2013; MATSUMOTO et al., 2006; PALOMANO et al., 2001; ZHANG et al., 2014).

Experiências clínicas e estudos comportamentais e anatômicos do uso do paclitaxel por via sistêmica em roedores sugerem que a neuropatia por paclitaxel pode ser um fenômeno gradual. Provavelmente o processo se inicia com uma neuropatia periférica dolorosa sem patologia neurológica grosseira, progride para uma neuropatia predominantemente sensorial com perda da função das fibras sensoriais grandes e pequenas e patologia moderada do nervo e, culmina com uma perda profunda da função sensorial e motora com extensas alterações anatômicas nervosas. Este processo progressivo pode ser inteiramente devido ao mecanismo de ação do paclitaxel, ou diferentes componentes do processo podem estar ligados a mecanismos distintos (PALOMANO et al., 2001).

Vários mecanismos estão supostamente envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática por administração de paclitaxel. Dina e colaboradores (2001) demonstraram o envolvimento de PKC e PKA no desenvolvimento de neuropatia periférica em ratos. Outro estudo demonstrou o envolvimento de canais para cálcio do tipo T na neuropatia em ratos, e uma baixa relevância dos receptores NMDA na dor induzida por paclitaxel (FLATTERS & BENNETT, 2004). Nieto e colaboradores (2012) demonstraram a grande relevância de receptores sigma 1 na neuropatia dolorosa induzida por paclitaxel. Outro estudo demonstra o envolvimento de receptores canabinoides neste modelo em camundongos (PARVATHY & MASOCHA, 2015). Materazzi e colaboradores (2012) demonstraram que o paclitaxel, por meio da formação de radicais de oxigênio, tem como alvo TRPA1 e TRPV4 e ambos os canais são fundamentais para o desenvolvimento retardado da alodínia mecânica.

2. JUSTIFICATIVA

O reposicionamento de fármacos se tornou uma estratégia promissora para a descoberta de novas abordagens farmacoterapêuticas. No que se refere a condições dolorosas e inflamatórias, o alívio da dor é uma necessidade clínica básica que deve ser atendida. O acoplamento de um doador de NO à nicotinamida dá origem ao nicorandil. Estudos têm demonstrado resultados positivos do nicorandil em modelos de dor inflamatória e nociceptiva e de migração de neutrófilos. Neste contexto, a investigação da atividade do nicorandil em modelos de dor neuropática, assim como dos possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade, pode levar a identificação de uma nova abordagem farmacoterapêutica eficaz e segura, uma vez que se trata de um fármaco conhecido e com perfil de segurança já estabelecido.

3. OBJETIVO

Avaliar a atividade do nicorandil em modelos experimentais de dor neuropática em camundongos, bem como os possíveis mecanismos que mediarão essa atividade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25 – 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, correspondente à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Foi mantido um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram acomodados em caixas de plástico (dimensões 40 x 34 x 17 cm) forradas com maravalha. Água e ração foram fornecidos *ad libitum* exceto quando o protocolo exigia administração *per os* (p.o.). Nesse caso, os animais foram submetidos à restrição alimentar de, no mínimo, 10 horas. Durante todos os protocolos, os animais foram manuseados de maneira cuidadosa, a fim de promover o menor estresse comportamental possível. Ao final 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 (Protocolo n°339/2015).

4.2. Drogas, fármacos e reagentes diversos

- ✓ Ácido nicotínico (Sigma, EUA) – Composto da vitamina B₃.
- ✓ Carboximetilcelulose (CMC; Galena, Brasil) – Veículo.
- ✓ Cloridrato de cetamina (União Química, Brasil) – Anestésico.
- ✓ Cloridrato de ciproheptadina (Sigma, EUA) – Antagonista serotoninérgico.
- ✓ Cloridrato de naltrexona (Sigma, EUA) – Antagonista opioidérgico.
- ✓ Cloridrato de xilazina (União Química, Brasil) – Coadjuvante de anestesia.
- ✓ Fenobarbital (Sanofi Aventis, Brasil) – Fármaco depressor do SNC.
- ✓ Glibenclamida (Sigma, EUA) – Bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes.
- ✓ Nicorandil – Nitrato de 2 - nicotinamidoetil; sintetizado pelo Prof. Ângelo de Fátima – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG – Fármaco antianginoso em uso clínico.
- ✓ Nicotinamida (Sigma, EUA) – Composto da vitamina B₃.
- ✓ Paclitaxel (Sigma, EUA) – Fármaco antineoplásico.

- ✓ Solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% p/v não injetável (Arboreto, Brasil) – Veículo usado para o preparo das soluções de CMC.
- ✓ Solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% p/v injetável (Equiplex, Brasil) – Veículo usado para o preparo do paclitaxel.

4.3. Preparo, dose e via de administração das soluções e suspensões

4.3.1. Solução de paclitaxel

A solução de paclitaxel foi preparada em solução de NaCl 0,9% p/v injetável imediatamente antes de cada administração. O paclitaxel foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) em volume de 2 mL/kg. A dose padronizada foi de 2 mg/kg.

4.3.2. Suspensões de nicorandil, nicotinamida e ácido nicotínico

As suspensões de nicorandil, nicotinamida e ácido nicotínico, para administração *p.o.*, foram preparadas em suspensão de CMC 0,5% p/v em solução de NaCl 0,9% p/v não injetável. O volume administrado para todas as substâncias foi de 8 mL/kg e as doses de nicotinamida (86,7 mg/kg) e ácido nicotínico (87,7 mg/kg) foram equivalentes ao nicorandil 150 mg/kg.

4.3.3. Solução de fenobarbital

A solução de fenobarbital foi preparada pela diluição do medicamento em solução de NaCl 0,9% p/v injetável. A dose utilizada foi de 50 mg/kg, *p.o.*, em volume de 8 mL/kg. O fenobarbital foi utilizado como controle positivo no modelo de haste girante e administrado 1 hora antes da avaliação da coordenação motora.

4.3.4. Soluções de naltrexona, glibenclamida e ciproheptadina

As soluções de naltrexona, glibenclamida e ciproheptadina foram preparadas em solução de NaCl 0,9% p/v injetável imediatamente antes da administração. As doses de naltrexona e ciproheptadina utilizadas foram 5 e 10 mg/kg. Estes compostos foram administrados por via i.p. em volume de 2 mL/kg. A glibenclamida, foi administrada *p.o.*, na dose de 20 e 40 mg/kg, em volume de 8 mL/kg.

4.4. Modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel

Os camundongos receberam injeções i.p. da solução de paclitaxel em salina. A dose administrada foi de 2 mg/kg e o volume de 2 mL/kg. Foram feitas quatro injeções i.p. em dias alternados (dias 1, 3, 5 e 7). O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento, porém com injeções de salina estéril.

4.5. Modelo experimental de dor neuropática 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, espaçadas em 1 mm uma das outras, no segmento exposto, com fio Cat-Gut 4.0 cromado (Brasuture, São Sebastião do Gramma, Brasil). A força de constrição foi exercida de forma a não impedir a circulação sanguínea pela vasculatura superficial epineural. Em seguida, a incisão foi suturada.

4.6. Avaliação da alodínia mecânica nos diferentes modelos de dor neuropática

Para avaliação da alodínia mecânica nos diferentes modelos experimentais de dor neuropática, 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 de realização do teste por no mínimo 60 minutos por dia durante dois dias antes da realização do experimento e por 20 minutos logo antes do início do experimento. A alodínia mecânica foi avaliada por meio de um analgesímetro digital (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) que consiste de um transdutor de pressão manual adaptado a uma ponteira de polietileno de 0,5 mm², o qual mede o limiar para a retirada da pata, expresso em gramas. O filamento foi aplicado sobre a superfície plantar da pata traseira direita com um aumento gradual de pressão até que o animal retirasse a pata (FIGURA 7). O valor da pressão que induz a retirada

da pata é registrado automaticamente, em uma faixa de 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N. Foram feitas cinco medições, com um intervalo de 20 segundos entre cada uma delas, em cada animal, sendo o maior e o menor valor eliminados e a resposta nociceptiva calculada como uma média das três medidas restantes. Os animais foram testados antes e depois dos tratamentos. O limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado no dia do 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 seis animais.



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

4.7. Tratamentos realizados no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel

Primeiramente, foi realizada a padronização do modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel, sendo utilizados dois grupos: o controle, o qual recebeu salina e, o grupo que recebeu paclitaxel. Foi feita a avaliação dos valores basais de retirada de pata dos animais. Em seguida, foram feitas quatro administrações i.p. de paclitaxel

(2 mg/kg) ou veículo (salina) em dias alternados (1°, 3°, 5° e 7° dias). A alodínia mecânica foi avaliada a cada dois dias, durante 14 dias.

Foram realizados seis protocolos de avaliação da atividade do nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel. O tratamento dos dois primeiros protocolos (FIGURAS 8 e 9) foi realizado no 7° dia após a primeira injeção de paclitaxel e, o terceiro e o quarto (FIGURAS 10 e 11) foram realizados no 14° dia. No primeiro e no terceiro protocolos os animais receberam uma administração de nicorandil, *p.o.*, nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg, e no segundo e quarto protocolos foram utilizadas as mesmas doses do fármaco e via de administração, porém o nicorandil foi administrado duas vezes, em um intervalo de duas horas. A alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 horas após a primeira administração do nicorandil em todos os protocolos mencionados.



Figura 8 - Primeiro protocolo (uma administração de nicorandil no 7° dia). Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.

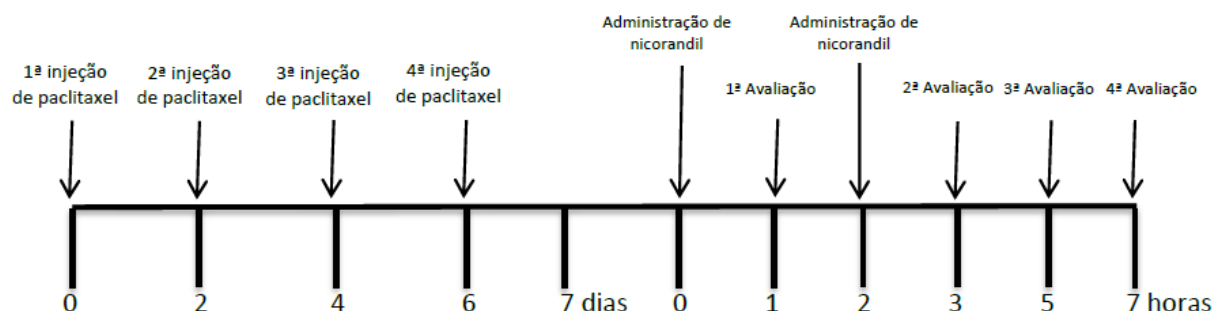


Figura 9 - Segundo protocolo (duas administrações de nicorandil no 7° dia). Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.



Figura 10 - Terceiro protocolo (uma administração de nicorandil no 14º dia). Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.



Figura 11 - Quarto protocolo (duas administrações de nicorandil no 14º dia). Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.

No quinto protocolo foi avaliado o efeito induzido por administrações repetidas do nicorandil sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel com a finalidade de investigar se o efeito do fármaco se mantém após administrações repetidas. Neste experimento, o nicorandil foi administrado duas vezes, com intervalo de duas horas, e foram utilizadas as doses de 100 e 150 mg/kg, *p.o.*, volume 8 mL/kg. As administrações foram realizadas no 14º, 15º ou 16º dias (FIGURA 12) e a alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 horas após a primeira administração do nicorandil em todos os dias mencionados.

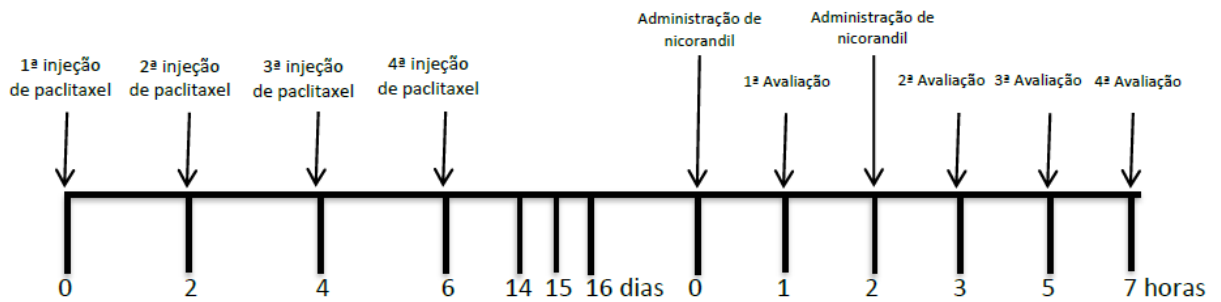


Figura 12 - Quinto protocolo (duas administrações de nicorandil no 14º, 15º e 16º dias). Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.

O sexto protocolo foi realizado no 14º dia após a primeira administração de paclitaxel, sendo comparada a atividade do nicorandil na dose de 150 mg/kg com nicotinamida e ácido nicotínico em doses equimolares (FIGURA 13). Os três fármacos foram administrados *p.o.* em volume de 8 mL/kg. Foram realizadas duas administrações de cada fármaco, com intervalo de duas horas, e a alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 horas após a primeira administração dos tratamentos.



Figura 13 - Sexto protocolo (duas administrações de nicorandil, nicotinamida e ácido nicotínico no 14º dia). Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.

4.8. Tratamentos realizados no modelo experimental de constrição do nervo isquiático

Inicialmente, foi realizada a padronização do modelo experimental de constrição do nervo isquiático e, para isto foi utilizado um grupo controle, que corresponde aos animais falso-operados, e um grupo operado. O grupo falso-operado foi composto por animais submetidos a uma falsa cirurgia, na qual o nervo não foi constringido, apenas visualizado. No grupo operado foram feitas três ligaduras, espaçadas em 1 mm uma das outras, com fio Cat-Gut 4.0 cromado, e em seguida os animais foram suturados.

O tratamento no modelo de dor neuropática induzida por constrição foi realizado no 14º dia após a cirurgia, sendo avaliada a atividade do nicorandil na dose de 150 mg/kg. O fármaco foi administrado *p.o.* em volume de 8 mL/kg. Foram realizadas duas administrações do nicorandil, em um intervalo de duas horas, e a alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 horas após a primeira administração do tratamento (FIGURA 14).



Figura 14 – Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental de constrição do nervo isquiático. Foram realizadas duas administrações de nicorandil no 14º dia.

4.9. Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida e ciproheptadina sobre a atividade do nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel

Com o objetivo de avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do nicorandil no modelo experimental de dor neuropática induzida

por paclitaxel, foram utilizados antagonistas opioidérgico (naltrexona), serotoninérgico (ciproheptadina) e um bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes (glibenclamida). Neste protocolo, o nicorandil foi administrado por duas vezes, *p.o.*, volume 8 mL/kg, em um intervalo de duas horas. A naltrexona e ciproheptadina (FIGURA 15) foram administradas 15 minutos antes da primeira administração do nicorandil, por via i.p., volume 2 mL/kg, enquanto a glibenclamida (FIGURA 16) foi administrada, *p.o.*, volume 8 mL/kg, 30 minutos antes da primeira administração de nicorandil. A alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 horas após a primeira administração do tratamento.



Figura 15 - Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil, após tratamento prévio com naltrexona ou ciproheptadina, sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel.



Figura 16 - Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo nicorandil, após tratamento prévio com glibenclamida, sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel.

4.10. Avaliação da atividade motora

A atividade motora foi avaliada na haste girante (FIGURA 17) (VAZ et al., 1996). Os animais foram treinados no aparato, a 14 rpm, durante dois dias antes do experimento, em duas sessões diárias, durante 2 minutos. 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, com exceção do controle positivo, os animais foram tratados por duas vezes, *p.o.*, em volume 8 mL/kg, em um intervalo de duas horas, com nicorandil 50, 100 ou 150 mg/kg, com o controle negativo (CMC) ou controle positivo (fenobarbital). Em seguida, os camundongos foram avaliados no aparato, a 14 rpm, na 1^a, 3^a, 5^a e 7^a hora após a primeira administração dos tratamentos (FIGURA 18), determinando-se o tempo de permanência. O tempo de corte foi de 2 minutos.



Figura 17 - Haste girante utilizada para avaliar a atividade motora de camundongos.

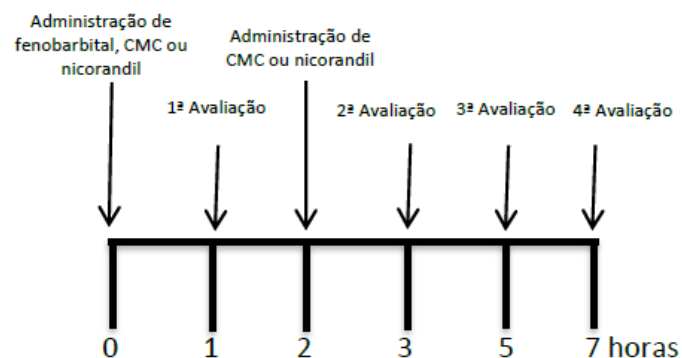


Figura 18 - Escala temporal de avaliação da atividade motora em camundongos.

4.11. Análise estatística

A análise estatística e apresentação gráfica dos resultados foram feitas por meio do programa *Graphic Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados referentes aos modelos de dor

neuropática e massa corporal foram analisados por meio da análise de variância de duas vias, seguida pelo teste Bonferroni. Os resultados referentes ao modelo de haste girante e área sob a curva foram analisados por meio da análise de variância simples, seguida pelo teste Dunnett's. Adotou-se um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização do modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel

Inicialmente, foi realizada a padronização do modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel. A alodínia mecânica, avaliada por meio da estimulação da pata traseira direita do animal, foi medida a cada dois dias durante 14 dias após a primeira injeção de paclitaxel (2 mg/kg, i.p.). Observou-se que a alodínia mecânica se estabeleceu dois dias após a primeira administração de paclitaxel, com limiar médio de 5,5 g, e se manteve durante todo o período avaliado. Os valores basais do limiar nociceptivo eram de aproximadamente 7,5 g e foram reduzidos para aproximadamente 3,5 g no grupo que recebeu o paclitaxel. Os animais do grupo controle receberam salina estéril (FIGURA 19). Em relação ao ganho de massa corporal, não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo que recebeu paclitaxel, sendo observado ganho de massa corporal em ambos os grupos (FIGURA 20).

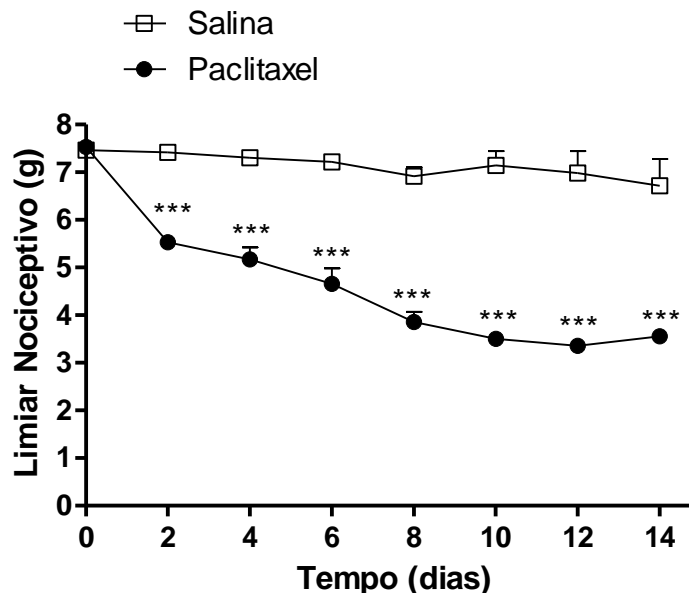


Figura 19 – Curso temporal da alodínia mecânica induzida por paclitaxel. O paclitaxel foi administrado na dose de 2 mg/kg (i.p.) em dias alternados (1º, 3º, 5º e 7º dias). Os animais do grupo controle receberam salina estéril (2 ml/kg, i.p.). *** indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n=6$.

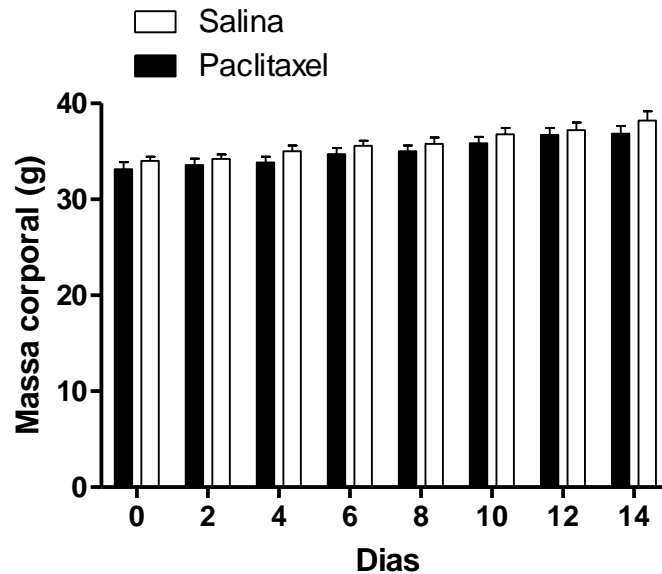
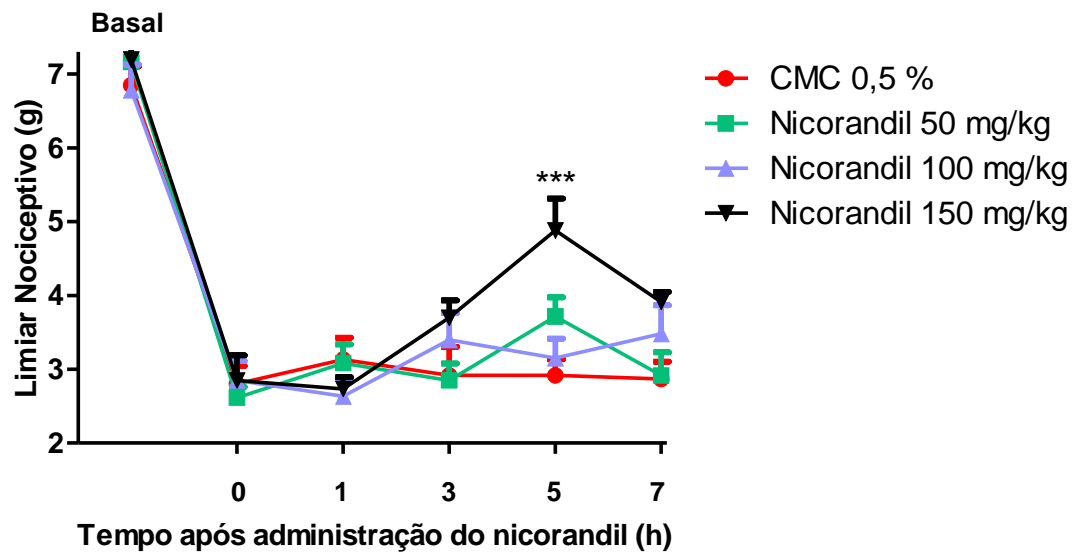


Figura 20 – Variações de massas corporais dos animais que receberam paclitaxel ou salina estéril. n=6.

5.2. Efeito induzido pelo nicorandil administrado no 7º dia sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel

No 7º dia após a primeira injeção de paclitaxel, o nicorandil foi administrado por meio de dois protocolos. No primeiro protocolo, foi realizada uma administração do nicorandil, nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg. O nicorandil nas doses de 50 ou 100 mg/kg não alterou a alodínia mecânica induzida por paclitaxel. A dose de 150 mg/kg atenuou a alodínia na 5ª hora após a administração do fármaco (FIGURA 21). No segundo protocolo, onde foram realizadas duas administrações de nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg) em um intervalo de duas horas, o nicorandil na dose de 50 mg/kg não alterou a alodínia mecânica induzida por paclitaxel. A dose de 100 mg/kg atenuou a alodínia na 3ª, 5ª e 7ª horas após a administração do fármaco. Na dose de 150 mg/kg, o nicorandil atenuou a alodínia mecânica em todo o período de avaliação (FIGURA 22).

(A)



(B)

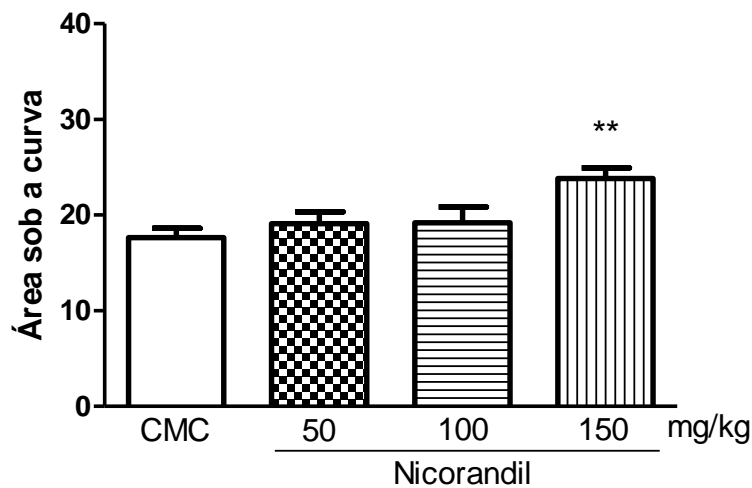


Figura 21 - Efeito induzido pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, uma administração, *p.o.*, 7^o dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

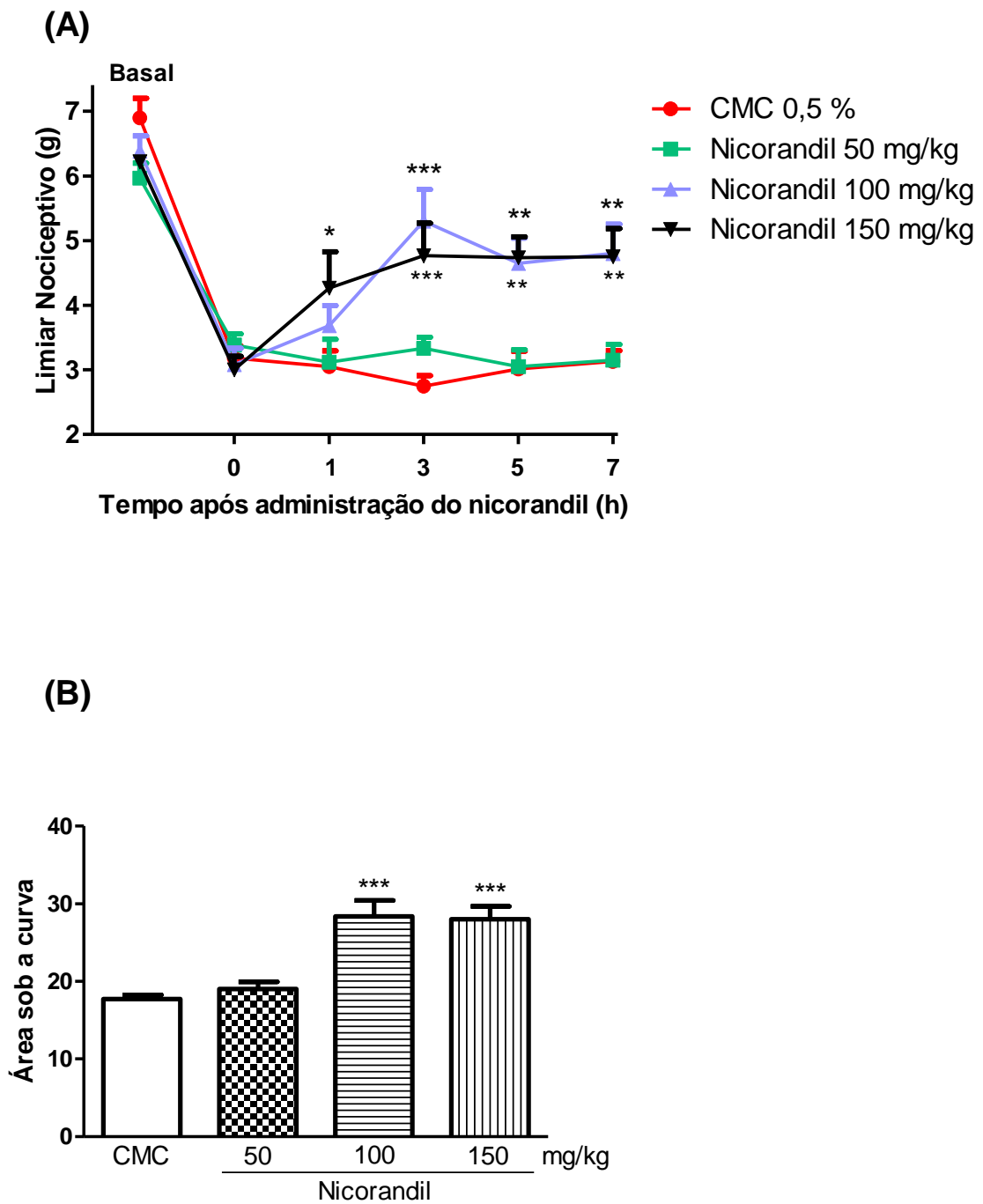


Figura 22 - Efeito induzido pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, duas administrações, *p.o.*, 7º dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

5.3. Efeito induzido pelo nicorandil administrado no 14º dia sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em camundongos

Assim como no 7º dia, o nicorandil também foi avaliado no 14º dia após a primeira injeção de paclitaxel por meio de dois protocolos. No primeiro protocolo, foi realizada uma administração do nicorandil, nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg. O nicorandil nas doses de 50 e 150 mg/kg atenuou a alodínia mecânica na 1ª e 5ª hora, e na dose de 100 mg/kg houve atenuação apenas na 1ª hora avaliada (FIGURA 23). No segundo protocolo, foram realizadas duas administrações de nicorandil (50, 100 e 150 mg/kg). O nicorandil na dose de 50 mg/kg alterou a alodínia somente na 1ª hora avaliada. O nicorandil na dose de 100 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica na 1ª e 5ª hora. Já na dose de 150 mg/kg, o nicorandil atenuou significativamente a alodínia mecânica na 3ª, 5ª e 7ª horas avaliadas (FIGURA 24).

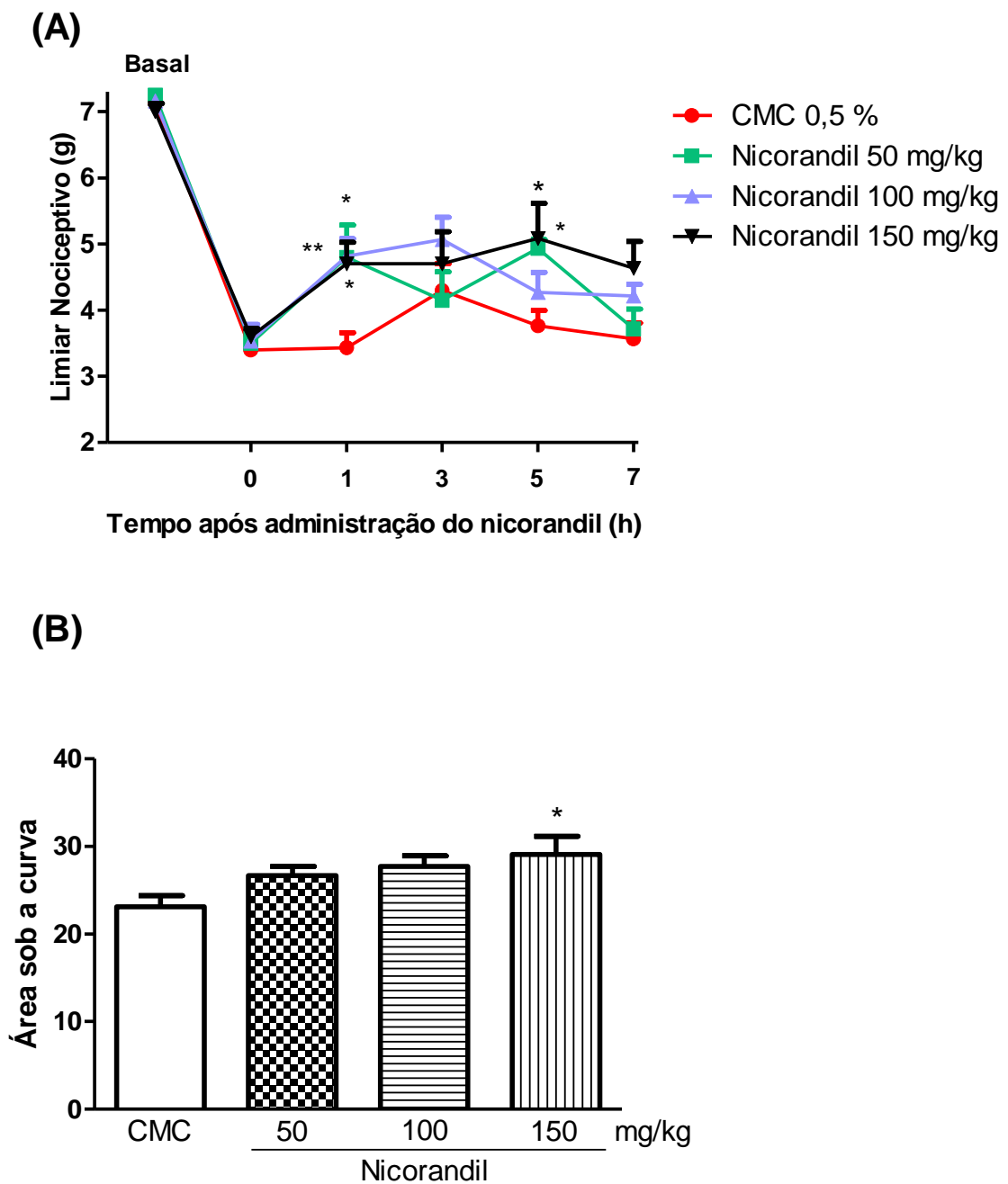


Figura 23 - Efeito induzido pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, uma administração, *p.o.*, 14° dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n = 6$.

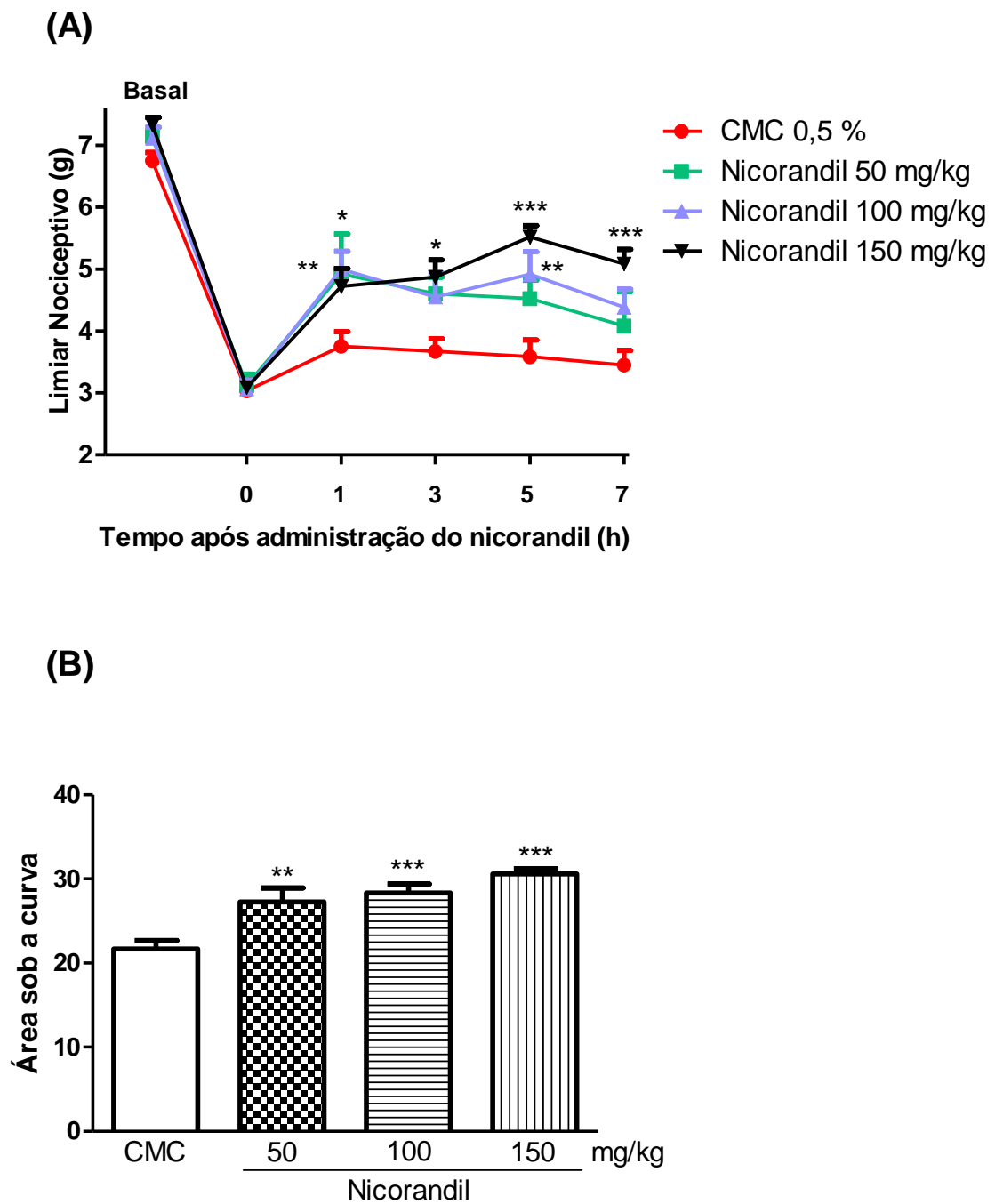


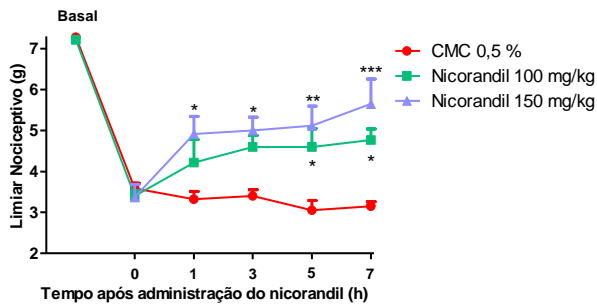
Figura 24 - Efeito induzido pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, duas administrações, *p.o.*, 14º dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

5.4. Efeito induzido por administrações repetidas de nicorandil no 14°, 15° ou 16° dias sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel

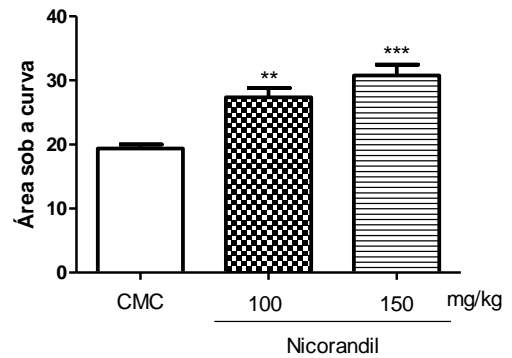
Em seguida, avaliamos o efeito induzido por administrações repetidas de nicorandil sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel. O nicorandil na dose de 100 mg/kg (duas administrações, *p.o.*), no 14° dia, atenuou a alodínia mecânica na 5ª e 7ª horas em relação ao grupo controle. Na dose de 150 mg/kg, observou-se que o nicorandil atenuou a alodínia mecânica em todos os tempos avaliados (FIGURA 25 A e B). No 15° dia, foi observada alteração da alodínia mecânica em todos os períodos avaliados para a dose de 150 mg/kg de nicorandil, porém não houve alteração para a dose de 100 mg/kg (FIGURA 25 C e D). No 16° dia, o nicorandil, na dose de 150 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica na 1ª, 3ª e 5ª horas após a primeira administração do fármaco (FIGURA 25 E e F). O limiar nociceptivo para o grupo controle permaneceu em torno de 3 g em todos os momentos de avaliação.

14^o dia

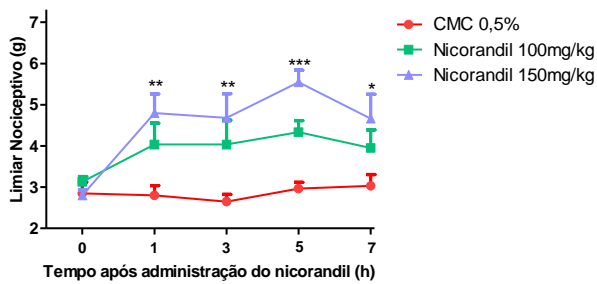
(A)



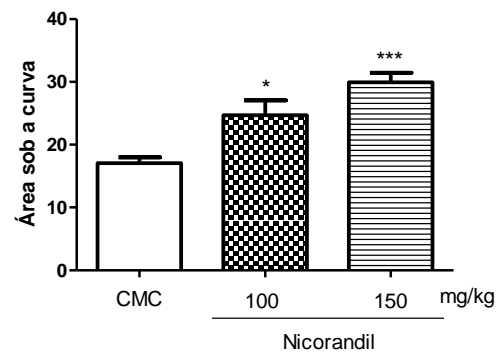
(B)

15^o dia

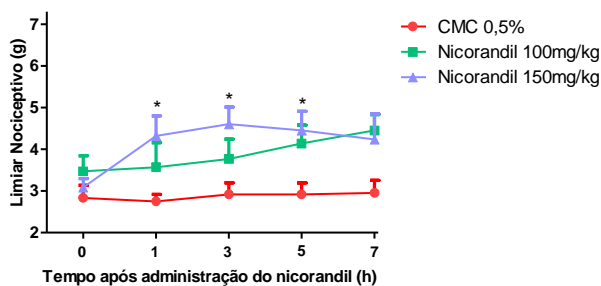
(C)



(D)

16^o dia

(E)



(F)

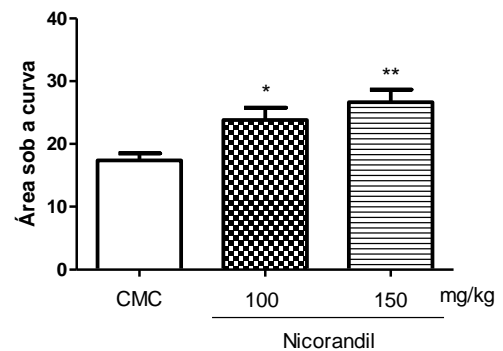


Figura 25 - Efeito induzido por administrações repetidas de nicorandil (100 ou 150 mg/kg, duas administrações, *p.o.*) no 14^o, 15^o e 16^o dias sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. (A, C e E) Curso temporal e (B, D e F) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

5.5. Efeito induzido pelo nicorandil sobre a atividade motora no modelo da haste girante

Com a finalidade de validar as conclusões obtidas a partir da análise dos efeitos induzidos pelo nicorandil nos diferentes modelos de dor neuropática, foram avaliados os efeitos induzidos por esse fármaco sobre a coordenação motora dos animais. O nicorandil nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg ou o veículo não alteraram o tempo de permanência dos animais na haste girante. Por outro lado, o fenobarbital, utilizado como controle positivo neste protocolo experimental, reduziu de forma marcante esse parâmetro (TABELA 1).

Tabela 1 – Efeitos induzidos pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, *p.o.*, - 1 h e + 2 h) ou pelo fenobarbital (50 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n=5-6$.

Tratamento	Tempo de permanência (s)				
	Basal	Após 1 h	Após 3 h	Após 5 h	Após 7 h
Veículo	120±0	120±0	120±0	120±0	120±0
Nicorandil 50 mg/kg	120±0	120±0	120±0	120±0	120±0
Nicorandil 100 mg/kg	120±0	120±0	120±0	120±0	120±0
Nicorandil 150 mg/kg	120±0	120±0	120±0	120±0	120±0
Fenobarbital 50 mg/kg	120±0	45±23,8**	77,8±23,7*	120±0	120±0

5.6. Efeito induzido pelo nicorandil ou por doses equimolares de nicotinamida ou ácido nicotínico sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel

No 14º dia após a primeira administração de paclitaxel, foi comparada a atividade do nicorandil na dose de 150 mg/kg (*p.o.*) com a nicotinamida e ácido nicotínico em doses equimolares. O nicorandil atenuou a alodínia mecânica em todas as horas avaliadas em relação ao grupo controle. Entretanto, esse efeito não foi induzido pela nicotinamida ou ácido nicotínico quando administrado em doses equimolares (86,7 e 87,7 mg/kg, *p.o.*, respectivamente) à dose de nicorandil (FIGURA 26).

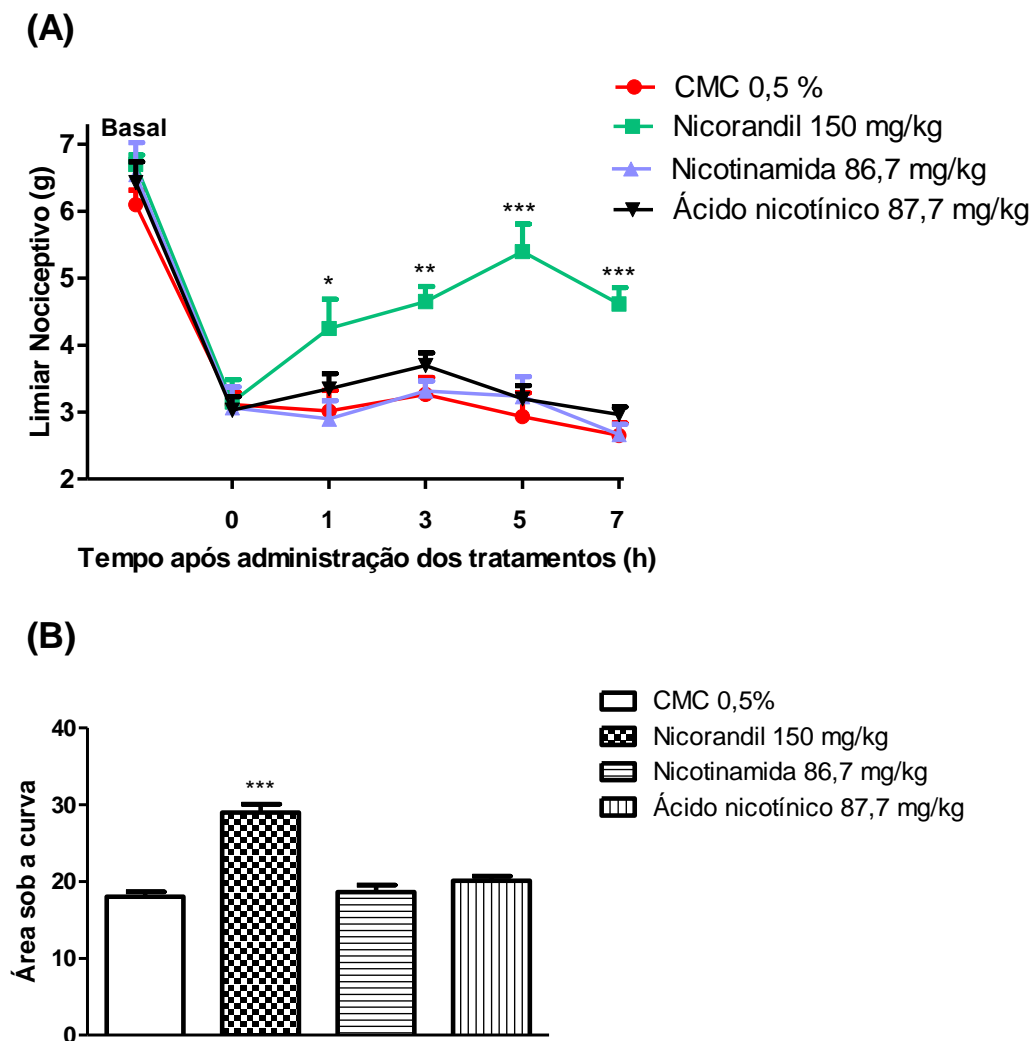


Figura 26 - Efeito induzido pelo nicorandil (150 mg/kg; *p.o.*) ou por doses equimolares de nicotinamida (86,7 mg/kg; *p.o.*) ou ácido nicotínico (87,7 mg/kg; *p.o.*) sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel. Foram realizadas duas administrações de nicorandil, nicotinamida ou ácido nicotínico. (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). $n = 6$.

5.7. Efeito induzido pelo nicorandil sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático

Inicialmente, foi realizada a padronização do modelo de dor neuropática induzida por constrição do nervo isquiático. A alodínia mecânica, avaliada por meio da estimulação da pata ipsilateral à constrição do nervo, foi avaliada a cada dois dias durante 14 dias após a cirurgia. Observou-se que a alodínia mecânica se

estabeleceu no 2º dia após a cirurgia, com limiar médio de 1,5 g e se manteve durante todo o período avaliado. Os valores basais do limiar nociceptivo eram de aproximadamente 6 g e atingiu como menor limiar o valor médio aproximado de 1,5 g (FIGURA 27).

No 14º dia após a cirurgia, foi avaliada a atividade do nicorandil na dose de 150 mg/kg. O nicorandil atenuou a alodínia mecânica na 1ª e 5ª horas avaliadas. (FIGURA 28).

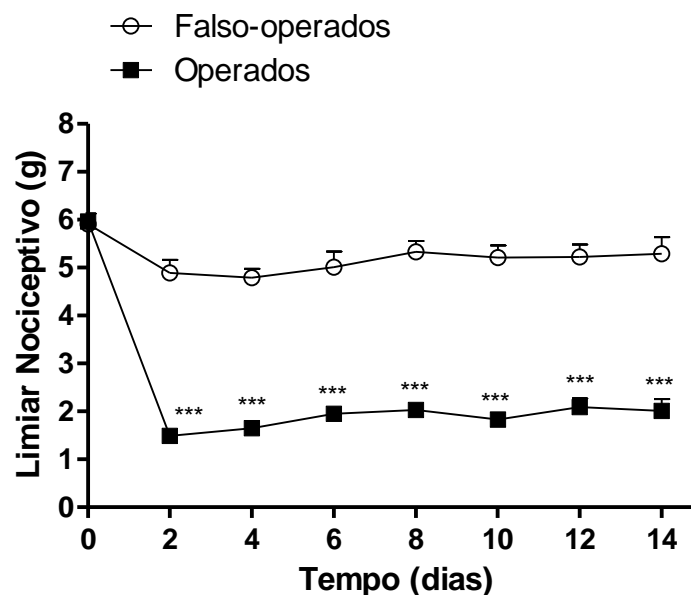


Figura 27 - Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático em camundongos. *** indica diferença estatística em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). $n=6$.

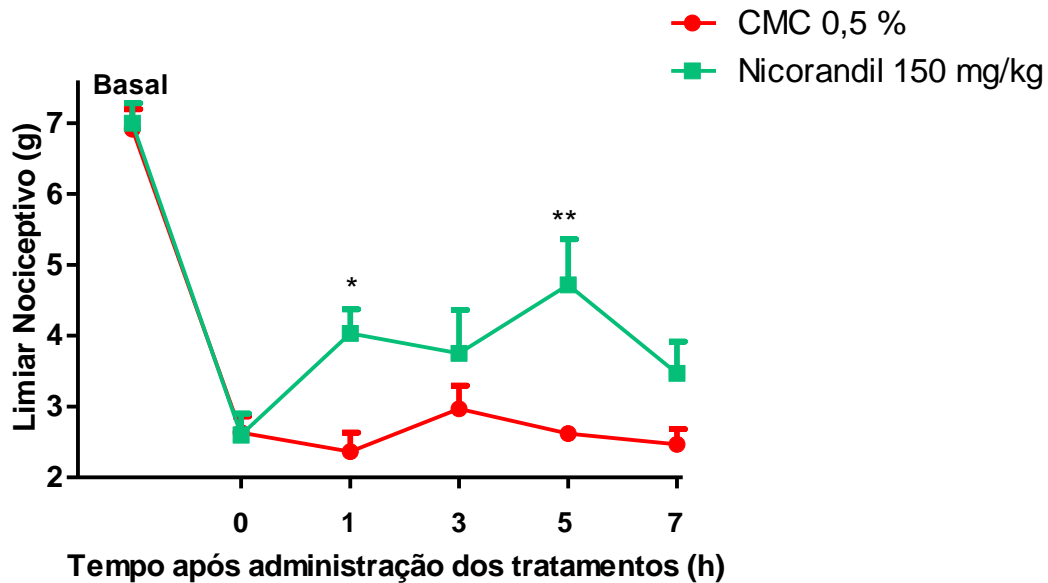


Figura 28 - Efeito induzido pelo nicorandil (150 mg/kg; *p.o.*) sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático. Foram realizadas duas administrações de nicorandil. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n = 6$.

5.8. Efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida sobre a atividade antialodínica do nicorandil

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela naltrexona sobre a atividade antinociceptiva do nicorandil, os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo controle foram de aproximadamente 2,8 g nos quatro momentos de avaliação. O tratamento com nicorandil reduziu a alodínia mecânica. Os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo que recebeu o tratamento com nicorandil foram de 5,7 g na 3ª e 5ª horas, e 5,3 g na 7ª hora. 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 (2,8; 3,0; 2,7; e 2,4 g na 1ª, 3ª, 5ª e 7ª horas, respectivamente). Entretanto, quando administrada previamente ao tratamento com nicorandil, a naltrexona, nas duas doses, atenuaram o efeito antinociceptivo induzido por este fármaco. Para a dose de 5 mg/kg, a atenuação ocorreu na 3ª e 5ª horas após a administração do nicorandil diminuindo o limiar nociceptivo para 4,1 e 3,8 g respectivamente; e para a dose de

10 mg/kg, isto ocorreu na 3^a, 5^a e 7^a horas, com redução do limiar nociceptivo para 3,7; 2,9 e 3,7 g respectivamente (FIGURA 29).

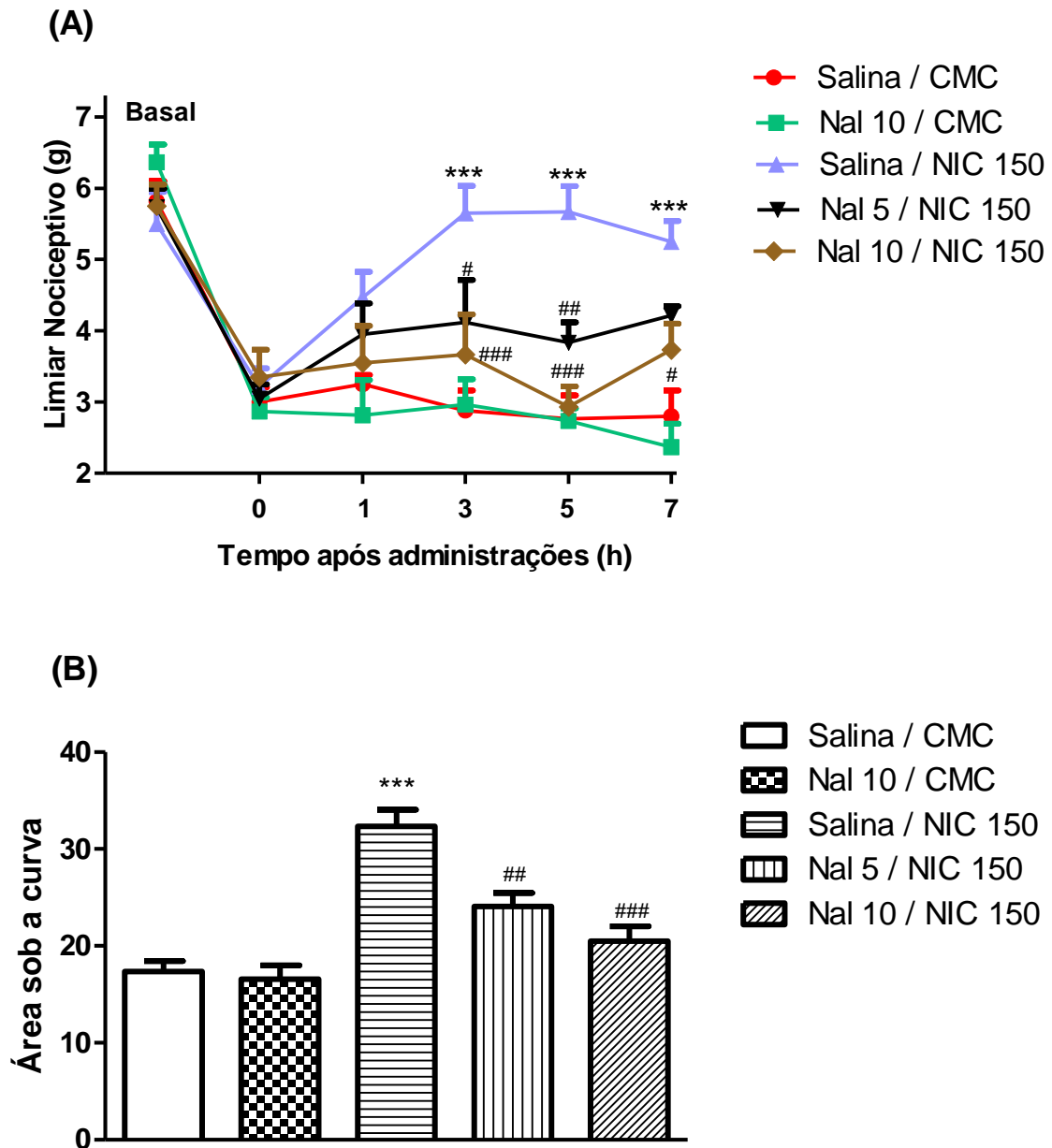


Figura 29 - Efeito induzido pela naltrexona (Nal; 5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antialodínica do nicorandil (NIC; 150 mg/kg, p.o.). A naltrexona foi administrada 15 min antes do nicorandil. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). #, ## e ### indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com nicorandil ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo do nicorandil, os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo controle foram de aproximadamente 2,8 g nos quatro momentos de avaliação. O tratamento com nicorandil reduziu a indução da alodínia mecânica. Os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo que recebeu o tratamento com nicorandil foram de 5,7 g na 3ª hora e 5 g na 5ª hora. A glibenclamida, administrada isoladamente na dose de 40 mg/kg, não inibiu a alodínia mecânica. Os valores médios do limiar nociceptivo para esse grupo não diferiram estatisticamente dos valores do grupo controle (2,7; 2,9; 2,8 e 2,6 g na 1ª, 3ª, 5ª e 7ª horas, respectivamente). A glibenclamida, nas doses de 20 e 40 mg/kg, não alterou a atividade antinociceptiva do nicorandil (FIGURA 30).

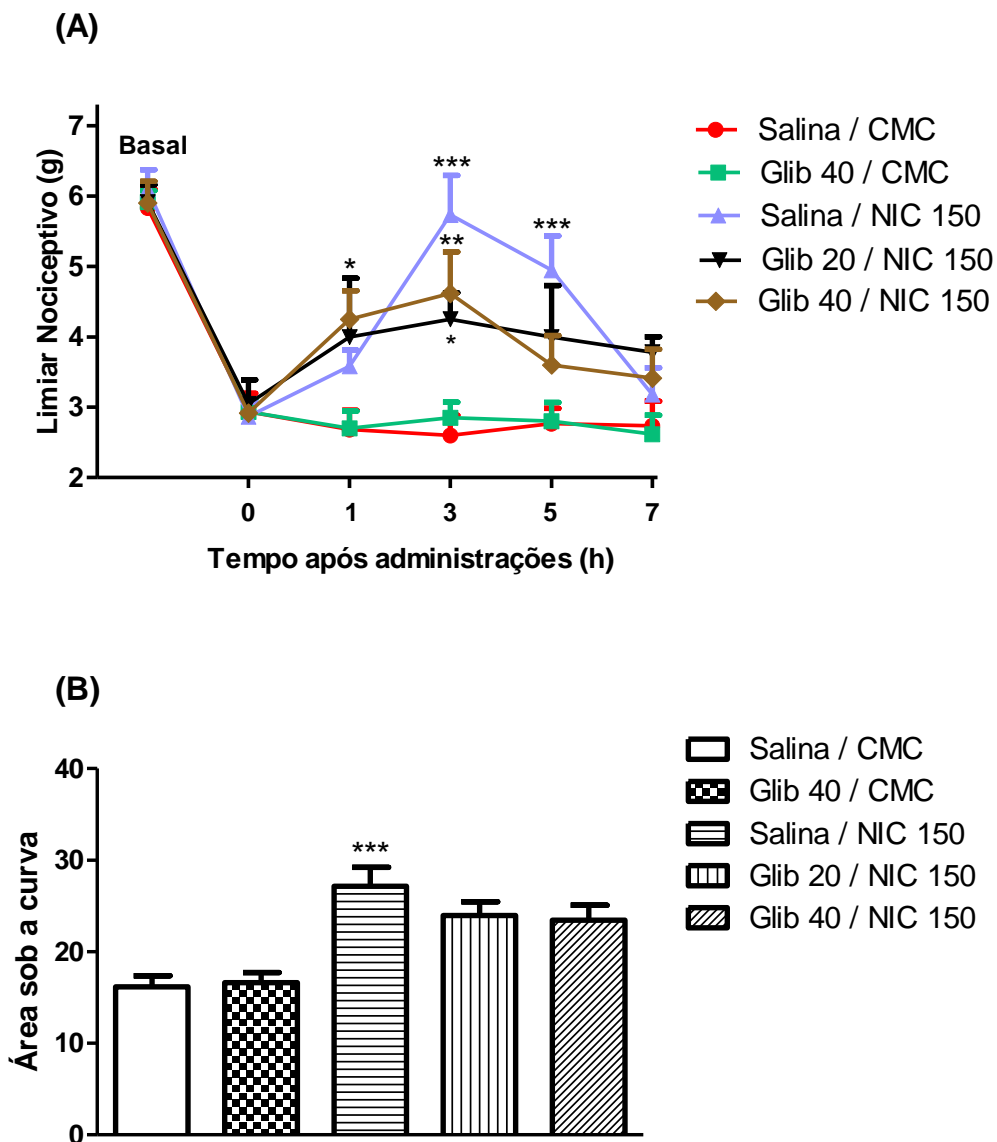


Figura 30 - Efeito induzido pela glibenclamida (Glib; 20 ou 40 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antialodínica do nicorandil (NIC; 150 mg/kg, *p.o.*). A glibenclamida foi administrada 0,5 h antes do nicorandil. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

No protocolo em que foi avaliado o efeito induzido pela ciproheptadina sobre a atividade antialodínica do nicorandil, os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo controle foram aproximadamente 3,0 g nos quatro momentos de avaliação. O tratamento com nicorandil reduziu a alodínia mecânica. Os valores médios do limiar nociceptivo para o grupo que recebeu o tratamento com nicorandil foram de 4,6 na

3ª hora e 4,7 g na 5ª hora. 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 (3,2; 2,9; 3,3 e 3,0 g na 1ª, 3ª, 5ª e 7ª horas, respectivamente). A ciproheptadina, nas doses de 5 e 10 mg/kg, alteraram a atividade antinociceptiva do nicorandil. Para a dose de 5 mg/kg, a atenuação ocorreu na 5ª hora após a administração do nicorandil diminuindo o limiar nociceptivo para 3,3 g; e para a dose de 10 mg/kg, isto ocorreu na 3ª hora, com redução do limiar nociceptivo para 3,1 g (FIGURA 31). Apesar dos valores médios do limiar nociceptivo para os grupos das duas doses diferirem estatisticamente dos valores do grupo tratado com nicorandil quando comparados em cada momento de avaliação, ao se fazer uma avaliação global foi verificada uma atenuação do efeito induzido pelo fármaco apenas para a maior dose de ciproheptadina (10 mg/kg).

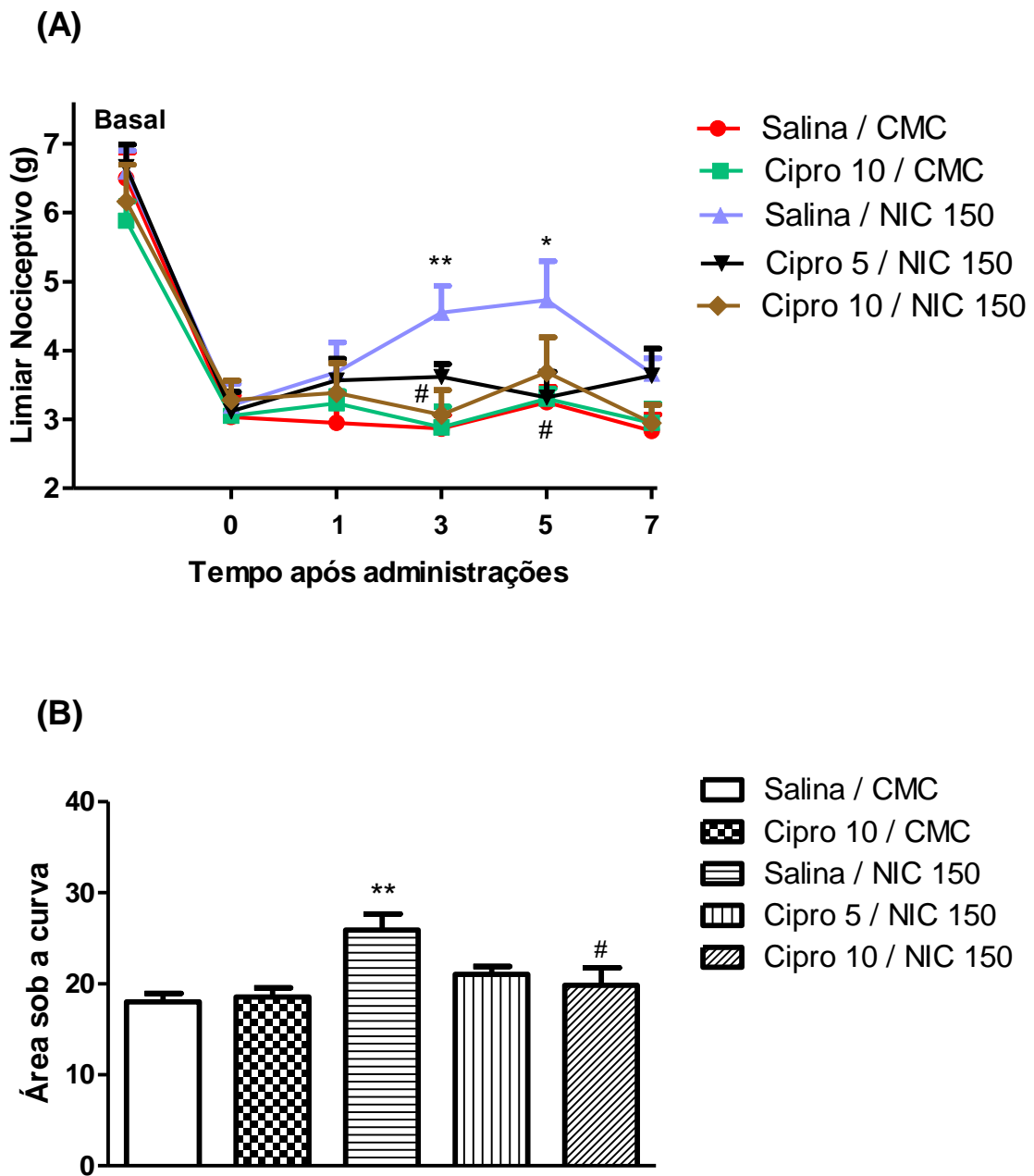


Figura 31 - Efeito induzido pela ciproheptadina (cipro; 5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antialodínica do nicorandil (NIC; 150 mg/kg, *p.o.*). A ciproheptadina foi administrada 15 min antes do nicorandil. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com nicorandil ($p < 0,05$). $n = 6$.

6. DISCUSSÃO

Devido ao grande número de doenças que provocam a dor neuropática, aos diversos mecanismos que podem levar ao desenvolvimento desta condição e aos perfis inadequados de eficácia e segurança dos fármacos em uso, é um desafio para a farmacologia moderna a busca de novas terapias para este tipo de dor crônica. O reposicionamento de fármacos é uma alternativa menos dispendiosa e com menor custo, já que fármacos em uso clínico geralmente possuem características farmacocinéticas e perfil de segurança bem estabelecidos (CHONG & SULLIVAN, 2007).

O nicorandil, um fármaco que tem sido usado no tratamento de pacientes com doença cardíaca isquêmica, é uma molécula resultante do acoplamento da nicotinamida a um doador de NO. Uma vez que há um grande interesse na avaliação da atividade de drogas ou fármacos acoplados a doadores de NO, o interesse na investigação da atividade do nicorandil em modelos de dor se torna evidente. Demonstramos, recentemente, que o nicorandil, de forma similar à nicotinamida, também apresenta atividade no modelo de dor nociceptiva e inflamatória induzida por formaldeído (DUTRA et al., 2013). Assim, em continuidade a essa linha de pesquisa, investigamos o efeito do nicorandil em modelos de dor neuropática em camundongos.

No presente estudo, foram avaliadas as atividades do nicorandil nos modelos de dor neuropática induzida por paclitaxel e induzida por constrição do nervo isquiático em camundongos e, comparou-se a atividade deste fármaco com seus metabólitos. O nicorandil, mas não a nicotinamida e ácido nicotínico, apresentou atividade no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel. A atividade antinociceptiva do nicorandil, no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel parece envolver mecanismos opioidérgicos e serotoninérgicos.

6.1. Atividade do nicorandil no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel em camundongos

Existem diversos modelos experimentais de dor neuropática. Um dos mais utilizados é o modelo de dor neuropática induzida por quimioterápicos (SMITH et al., 2004; WARD et al., 2011; AMI et al., 2012; THANGAMANI et al., 2013). Estes modelos

são favoráveis aos cirúrgicos uma vez que, apresentam maior facilidade de execução e a reprodutibilidade dos dados, principalmente em camundongos, em que o pequeno tamanho dificulta a cirurgia. O quimioterápico paclitaxel produz frequentemente neuropatia periférica em seres humanos. Em ratos, quatro injeções i.p. de paclitaxel produzem uma neuropatia bilateral duradoura. Os sintomas desta neuropatia incluem alodínia mecânica e hiperalgesia e hiperalgesia de calor (POLOMANO et al., 2001). Acredita-se que o paclitaxel produza dano ao nervo por interromper a ação dos microtúbulos necessários para o transporte axonal (DE BRABANDER et al., 1981).

Inicialmente, realizamos a padronização dos modelos experimentais. Neste estudo, foram utilizados dois modelos para indução de dor neuropática: a induzida por paclitaxel e a constrição do nervo isquiático. No modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel, a alodínia mecânica foi acentuada já no segundo dia após à primeira administração do paclitaxel; e na constrição do nervo isquiático a alodínia mecânica foi significativa no segundo dia após a cirurgia. Em ambos os métodos, a alodínia se manteve durante duas semanas. Outro aspecto relevante é o fato de que a administração repetida de paclitaxel não alterou o aumento de massa corporal dos animais durante o período de avaliação.

Sabe-se que diversos mecanismos podem levar ao desenvolvimento da dor neuropática. Os principais são: atividade ectópica de neurônios, sensibilização periférica e central e neuroinflamação (BARON et al., 2010; HEHN et al., 2012; SCHOLZ & WOOLF, 2002). A sensibilização de nociceptores é mediada pela família de TRP de canais catiônicos não específicos (NICKEL et al., 2012). Foi demonstrado que o paclitaxel tem como alvo TRPA1 e TRPV4 e ambos os canais são fundamentais para o desenvolvimento retardado da alodínia mecânica; e que a alodínia fria é, no entanto, inteiramente dependente de TRPA1 (MATERAZZI et al., 2012). Neurônios sensoriais periféricos nos gânglios da raiz dorsal apresentam também canais iônicos que expressam canais de cálcio tipo-T. Bourinet e colaboradores (2016) revelam a importância destes canais de cálcio com baixa tensão na excitabilidade celular em diferentes etapas das vias da dor. Outro importante estudo demonstrou que os canais de cálcio do tipo T podem desempenhar um papel na neuropatia induzida pela quimioterapia (FLATTERS & BENNETT, 2004). Na atividade ectópica ocorre aumento da concentração de canais

de sódio de qualquer tipo no local da lesão e em todo o axônio. Os neurônios sensoriais contêm dois grupos de canais de sódio com voltagem de tensão: o TTX-S e TTX-R, sendo estes últimos detectados apenas em neurônios sensoriais nociceptores. Foi demonstrado que o TTX-S desempenha um papel na patogênese da dor neuropática induzida pela quimioterapia (NIETO et al., 2008). A sensibilização central envolve a fosforilação de receptores NMDA e AMPA ou a expressão de canais de sódio voltagem-dependentes. Flatters e Bennett (2004) demonstraram que um potente antagonista de receptor NMDA não produziu qualquer inversão significativa da alodínia/hiperalgesia mecânica no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel, sugerindo que os receptores NMDA têm menor relevância na dor induzida por este quimioterápico. Outro estudo demonstrou que receptores sigma-1, que apresentam um importante papel nos diferentes tipos de dor e nos mecanismos de sensibilização central, desempenham função chave na neuropatia induzida por paclitaxel (NIETO et al., 2012).

Foi demonstrado que medicamentos doadores de NO apresentam atividade antinociceptiva (SOARES et al., 2000). Reis e Rocha (2006) demonstraram o efeito de um doador de NO (nitroprussiato de sódio) no modelo de constrição do nervo isquiático, administrado no 14º dia após a cirurgia em ratos. O nitroprussiato de sódio exerceu efeito analgésico de longa duração. O nicorandil [N-(2-hidroxietil) nitrato de nicotinamida] tem uma estrutura química resultante da combinação de um nitrato orgânico à molécula da nicotinamida, e é um doador de NO. Em estudos do nosso grupo, já foi demonstrado que o nicorandil apresenta atividade no modelo de dor nociceptiva e inflamatória induzida por formaldeído e, alodínia mecânica induzida por carragenina (DUTRA et al., 2013; DUTRA et al., 2015). Os resultados do presente estudo representam a primeira demonstração de que a administração sistêmica de nicorandil induz efeito antinociceptivo no modelo experimental induzido por paclitaxel em camundongos.

Demonstramos que o nicorandil apresentou atividade antinociceptiva no modelo induzido por paclitaxel quando administrada uma ou duas vezes no sétimo e no décimo quarto dia após a primeira injeção de paclitaxel. Porém, os resultados foram mais significativos quando este fármaco foi administrado duas vezes, em um intervalo de duas horas.

Como o nicorandil apresentou atividade antinociceptiva mais significativa nas doses de 100 e 150 mg/kg quando administrada duas vezes, avaliou-se se este resultado se mantinha após administrações repetidas no décimo quarto dia após a primeira injeção de paclitaxel. Quando avaliada no 14º, 15º ou 16º dias, a atividade antinociceptiva se manteve. É importante ressaltar que o nicorandil foi capaz de atenuar a alodínia mecânica já estabelecida no modelo experimental avaliado. Esse resultado reforça a atividade antialodínica do fármaco, uma vez que muitos fármacos não inibem ou reduzem em pequena magnitude a resposta antinociceptiva neste modelo. Dutra et al. (2013) demonstraram que a administração sistêmica do nicorandil, induz efeito antinociceptivo em modelo experimental de dor nociceptiva/inflamatória. Neste estudo, é sugerido que a atividade do nicorandil pode estar relacionado a um efeito antinociceptivo indireto induzido pela nicotinamida ou pelo NHN (principal metabólito do nicorandil), um efeito indireto induzido pela liberação de NO, um efeito antinociceptivo induzido diretamente pelo nicorandil ou a combinação de dois ou mais mecanismos sugeridos. Há evidência de que o nicorandil, apesar de ser um fármaco doador de NO, apresenta muitas diferenças em relação à outros fármacos que também liberam NO, particularmente os nitratos orgânicos. A avaliação da atividade antinociceptiva do nicorandil no modelo de resposta nociceptiva (formaldeído) indica que o NO não parece ser um mediador absolutamente necessário para essa atividade (DUTRA et al. 2013).

Ainda em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, Matsui et al. (2015) demonstraram que o nicorandil reduz o acúmulo de neutrófilos em modelo de pleurisia induzida por carragenina e inibe a produção de citocinas inflamatórias e também de PGE₂. Estes efeitos também podem contribuir para a atividade do nicorandil em modelos de dor neuropática, uma vez que estas células e mediadores tem papel importante na gênese da sensibilização dos nociceptores induzida por lesões de nervos ou por quimioterápicos (SCHOLZ & WOOLF, 2002). Ainda é importante considerar que a atividade do nicorandil se mantém com administrações repetidas em modelo de dor neuropática induzida por quimioterápico, o que torna este resultado relevante uma vez que, pacientes com neuropatias são tratados com fármacos analgésicos por longos períodos. Assim, podemos perceber que existe uma complexidade dos mecanismos associados aos efeitos induzidos pelo

nicorandil que, apesar de ser um doador de NO, não tem comportamento idêntico aquele dos nitratos orgânicos tradicionais.

Com o objetivo de validar os resultados positivos do nicorandil, os animais foram submetidos à avaliação da atividade motora no modelo da haste girante. Uma vez que o nicorandil não alterou o tempo de permanência dos animais neste modelo, é muito pouco provável que atenuação do comportamento nociceptivo induzido por esse fármaco seja resultado de comprometimento da atividade motora ou de relaxamento muscular.

6.2. Ausência da atividade dos metabólitos nicotinamida e ácido nicotínico no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel

Como a nicotinamida e o ácido nicotínico podem ser formados durante a biotransformação do nicorandil (PISANO et al., 2016), é importante avaliar se os dois metabólitos podem mediar a atividade do nicorandil no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel. Nicotinamida apresenta atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor nociceptiva e inflamatória (GODIN et al., 2011) e pode ser formada a partir do nicorandil *in vivo* (FRYDMAN, 1989); e o ácido nicotínico, outro produto de biotransformação do nicorandil (PISANO et al., 2016), também apresenta atividade antinociceptiva nos mesmos modelos citados (GODIN et al., 2012). Entretanto, diante dos resultados obtidos, onde utilizou-se uma dose de nicotinamida e ácido nicotínico equimolar à maior dose do nicorandil não observamos atividade antinociceptiva dos metabólitos no modelo avaliado. Desta forma, provavelmente o efeito do nicorandil não se dá devido à atividade resultante da ação da nicotinamida ou do ácido nicotínico neste modelo. Considerando que o nicorandil e a nicotinamida possuem semelhanças estruturais evidentes, fica claro que o acoplamento de um grupo doador de NO à nicotinamida resulta em uma molécula mais potente.

Possivelmente a atividade nos modelos de dor crônica pode ocorrer devido à ação do NO ou resulta da ação do nicorandil, sem que seja necessária sua biotransformação. Sabe-se que drogas doadoras de NO apresentam atividade antinociceptiva (ROMERO-SANDOVAL et al., 2002; SOARES et al., 2000) e o nicorandil possui a capacidade de liberar NO (SAKAI et al., 2000). Foi demonstrado que doses reduzidas (até 2 µg, i.t.) de SIN-1, doador de NO muito usado em estudos

em animais experimentais, reduzem a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático e teste de retirada de cauda em ratos. Porém, esse mesmo efeito não foi observado quando foram usados em doses elevadas ou em outros modelos de nocicepção (SOUSA & PRADO, 2001). Ainda, foi demonstrado que o nitroparacetamol, outro doador de NO, apresenta atividade anti-inflamatória genuína e induz efeito antinociceptivo no modelo experimental de dor neuropática induzida por constrição do nervo isquiático em ratos (ROMERO-SANDOVAL et al., 2007).

6.3. Mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do nicorandil

Neste estudo, também foram investigados mecanismos bioquímicos que poderiam contribuir para a atividade antinociceptiva do nicorandil no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel. O nicorandil apresenta um mecanismo de ação duplo: atua como vasodilatador relaxando os músculos vasculares lisos através do aumento de GMPc por meio da liberação de NO, e outro efeito mais importante é que, em mitocôndrias cardíacas, o nicorandil ativa os canais para K⁺ sensíveis a ATP, exercendo um efeito cardioprotetor direto (CARREIRA et al., 2007). Apesar destes mecanismos serem bem compreendidos no contexto cardiovascular, eles podem não ser os principais responsáveis pelo seu efeito antinociceptivo. Em estudos anteriores, demonstramos em modelos agudos, que a atividade antinociceptiva do nicorandil é parcialmente mediada pela ativação da GC, mas não por canais para potássio ATP-dependentes (DUTRA et al., 2013). Ainda observamos que o efeito antinociceptivo do nicorandil é atenuado por antagonista opioide. Desta forma, a fim de identificar mecanismos bioquímicos pelos quais o nicorandil exerce sua atividade antinociceptiva no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel, foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas: naltrexona (antagonista opióide não seletivo), glibenclamida (bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes) e ciproheptadina (antagonista serotoninérgico não seletivo).

As vias opioidérgicas estão envolvidas nos mecanismos de dor neuropática. Um estudo demonstrou que houve redução da intensidade da dor neuropática em pacientes usando agonista μ -opióide (levorfanol), porém, para isto, eram necessárias altas doses do fármaco (ROWBOTHAM et al., 2003). No presente estudo, a administração prévia de naltrexona atenuou a atividade antinociceptiva do nicorandil, indicando que essa atividade depende em parte da ativação de vias

opioidérgicas. A atenuação da atividade do nicorandil em animais previamente tratados com naltrexona indica que esse fármaco poderia interagir com receptores opióides ou estimular a liberação de peptídeos opióides endógenos, o que poderia contribuir para a atividade antinociceptiva em alguns modelos experimentais. Demonstramos recentemente que o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil é marcadamente atenuado por um antagonista opióide em modelos de dor inflamatória e nociceptiva, o que fornece informações sólidas sobre um mecanismo importante que medeia a atividade deste fármaco antianginoso (DUTRA et al., 2015). Entretanto como a naltrexona é um antagonista não-seletivo de receptores opióides (GUTSTEIN & AKIL, 2005), não é possível inferir qual ou quais receptores opióides (μ , κ , ou δ) medeiam a atividade antinociceptiva do nicorandil..

A glibenclamida é um hipoglicemiante oral, usado no tratamento de pacientes diabéticos, pertencente à classe das sulfoniluréias. É um inibidor da abertura dos canais de potássio ATP-dependentes (RANG et al. 2003). Desta forma, esse fármaco também representa uma ferramenta farmacológica importante para a investigação experimental da participação desses canais em diferentes fenômenos biológicos. Sabe-se que bloqueadores dos canais para potássio ATP-dependentes, como a glibenclamida, atenuam a atividade antinociceptiva de vários fármacos (ALVES & DUARTE, 2002; SACHS et al., 2004), inclusive do nicorandil. Um estudo demonstrou que o nicorandil, por via epidural, potencializou a ação analgésica da morfina no teste de retirada de cauda em ratos, e que a administração de glibenclamida pela mesma via, antagonizou este efeito, indicando que, provavelmente a potencialização do efeito da morfina ocorreu por meio da abertura de canais para potássio ATP dependentes à nível da medula espinhal (ASANO, et al. 2000). Nos resultados do presente estudo, porém, a glibenclamida não atenuou a atividade antinociceptiva do nicorandil no modelo de dor neuropática avaliado.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) compõe o grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores) amplamente distribuídas tanto na periferia como no SNC. A serotonina pode apresentar um estímulo nociceptivo no SNP e pode ter atividades nociceptivas e antinociceptivas no SNC a nível espinhal (RAIMUNDO et al., 2009; VIGUIER et al., 2013). Panczyk e colaboradores (2015) publicaram um estudo demonstrando que o sistema serotoninérgico está envolvido nos mecanismos patológicos da dor neuropática. Estes autores expõem que os mecanismos de dor

neuropática envolvem receptores 5-HT1A/1B/1D, 5-HT2A/2B/2C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT6, 5-HT7, assim como, o transportador de serotonina e que, alterações em suas expressões modulam a dor principalmente por afetar a transmissão através de vias descendentes serotoninérgicas. A ciproheptadina, antagonista de receptores serotoninérgicos não seletivo (GRAUDINS et al., 1998), quando administrada previamente ao nicorandil, inibiu sua atividade no modelo de dor neuropática. A inibição da atividade do nicorandil 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 no modelo experimental de dor neuropática induzida por paclitaxel.

Diante dos resultados do presente estudo, sugere-se que a atividade do nicorandil no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel envolva a ativação de vias opioidérgicas e serotoninérgicas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram a atividade antinociceptiva do nicorandil nos modelos de dor neuropática avaliados em camundongos. Esta atividade foi observada quando a sensibilização das vias nociceptivas já está estabelecida. Essa atividade não parece ser mediada pela nicotinamida ou ácido nicotínico, já que estes metabólitos não apresentaram atividade no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel. A ativação de mecanismos opioidérgicos e serotoninérgicos parece mediar a atividade antinociceptiva do nicorandil. Provavelmente, esta atividade não envolve o mecanismo de canais para potássio ATP-dependentes. Os resultados demonstram que o nicorandil pode representar uma alternativa importante na farmacoterapia de pacientes com dor neuropática e servem de estímulo à realização de ensaios pré-clínicos em outros modelos experimentais de dor crônica com objetivo de caracterizar de forma mais ampla a atividade antinociceptiva do nicorandil e, desta forma, justificar a realização de ensaios clínicos para investigar o potencial uso desse fármaco como analgésico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMI, N.; OKAMOTO, K.; OSHIMA, H. Analgesic effect of magnetic stimulation on paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in mice. *Brain Research*, v. 1461, p. 24 - 29, 2012.

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.

ASANO, T.; DOHI, S.; IIDA, H. Antinociceptive action of epidural K⁺ ATP channel openers via interaction with morphine and an α 2-adrenergic agonist in rats. *Anesthesia & Analgesia*, v. 90, p. 1146 - 1151, 2000.

ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R.; HAANPAA, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T. S.; NURMIKKO, T. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *European Journal of Neurology*, v. 17, p. 1113 - 1123, 2010.

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

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, p. 267 - 284, 2009.

BENNETT, GJ; XIE, YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v. 33, p. 87-107, 1988.

BOURINET, E.; FRANCOISE, A.; LAFFRAY, S. T-type calcium channels in neuropathic pain. *Pain*, v. 157, p. 15 - 22, 2016.

BRITO, A.M.S. Avaliação da atividade da leflunomida em modelos de dor nociceptiva, inflamatória e neuropática. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

CARREIRA, R.; MONTEIRO, P.; GONÇALVES, L.M.; PROVIDÊNCIA, L.A. O nicorandil preserva a funcionalidade do sistema fosforilativo e oxidativo mitocondrial num modelo animal de isquemia-reperfusão global. *Revista Portuguesa Cardiologia*, v. 26, p. 521 - 528, 2007.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, p. 417 - 423, 2002.

CÉSAR, I. C.; GODIN, A. M.; ARAUJO, D. P.; OLIVEIRA, F. C; MENEZES, R. R.; SANTOS, J. R. A.; ALMEIDA, M. O.; DUTRA, M. M. G. B.; SANTOS, D. A.; MACHADO, R. R.; PIANETTI, G. A.; COELHO, M. M.; FÁTIMA, A. Synthesis, antinociceptive activity and pharmacokinetic profiles of nicorandil and its isomers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 2783 - 2790, 2014.

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

COHEN, M.; QUINTNER, J.; BUCHANAN, D. Is chronic pain a disease? *Pain Medicine*, v. 14, p. 1284 - 1288, 2013.

DE BRABANDER, M.; GEUENS, G.; NUYDENS, R.; WILLEBRORDS, R.; DE MEY, J. Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, p. 5608 - 5612, 1981.

DELLAROZA, M.S.G.; FURUYA, R.K.; CABRERA, M.A.S.; MATSUO, T.; TRELHA, C.; YAMADA, K.N.; PACOLA, L. Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos utilizados por idosos da comunidade. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 54, p. 36 - 41, 2008.

DINA, O.A.; CHEN, X.; REICHLING, D.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase C ϵ and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience*, v. 108, p. 507 - 515, 2001.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, p. 343 - 350. 2003.

DUTRA, M.M.G.B.; GODIN, A.M.; CÉSAR, I.C.; NASCIMENTO JR., E.B.; MENEZES, R.R; FERREIRA, W.C.; SOARES, D.G.; SENIUK, J.G.T.; ARAÚJO, D.P.; BASTOS, L.F.S.; PIANETTI, G.A.; FÁTIMA, A.; 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.

DUTRA, M.M.G.B.; JÚNIOR, E.B.N.; GODIN, A.M.; BRITO, A.M.S.; MELO, I.S.F.; AUGUSTO, P.S.A.; RODRIGUES, F.F.; ARAÚJO, D.P.; FÁTIMA, A.; COELHO, M.M.; MACHADO, R.R. Opioid pathways activation mediates the activity of nicorandil in experimental models of nociceptive and inflammatory pain. *European Journal of Pharmacology*, v. 768, p. 160 - 164, 2015.

EGRED, M. Nicorandil - associated ulcerations. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v. 19, p. 395 - 398, 2007.

FILHO, R.F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 46, p. 265 - 271, 2000.

FLATTERS, S.J.L.; BENNETT, G.J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*, v. 109, p. 150 - 161, 2004.

FLOR, H. Psychological pain interventions and neurophysiology. *American Psychologist*, v. 69, p. 188 - 196, 2014.

FRYDMAN, A. M.; CHAPELLE, P.; DIEKMANN, H; BRUNO, R.; THEBAULT, J. J.; CAPLAIN, H.; UNGETHUEM, W.; GAILLARD, C.; LE LIBOUX, A. Pharmacokinetics of nicorandil. *American Journal of Cardiology*, v. 63, p. 25 - 33, 1989.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic pain: Principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 90, p. 532 - 545, 2015.

GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; SENIUK, J. G.; PAIVA, A. L.; MERLO, L. A.; NASCIMENTO JUNIOR, E. B.; 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, p. 782 - 788, 2011.

GODIN, A.M.; FERREIRA, W.C.; ROCHA, L.T.S.; FERREIRA, R.G.; PAIVA, A.L.L.; MERLO, L.A.; JR., E.B.N.; BASTOS, L.F.S.; COELHO, M.M. Nicotinic acid induces antinociceptive and anti-inflammatory effects in different experimental models. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 101, p. 493 - 498, 2012.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiology & Behaviour*, v. 47, p. 963 - 991, 1990.

GRAUDINS, A.; STEARMAN, A.; CHAN, B. Treatment of the serotonin syndrome with cyproheptadine. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 16, p. 615 - 619, 1998.

GUSTEIN, H.B.; AKIL, R. Analgésicos opioides. *Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica*. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. Cap. 23, p. 427 - 464.

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

HONEY, C.M.; TRONNIER, V.M.; HONEY, C.R. Deep brain stimulation versus motor cortex stimulation for neuropathic pain: A minireview of the literature and proposal for future research. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 14 p. 234 - 237, 2016.

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, p. 2204 - 2205, 2011.

JULIUS, D. TRP channels and pain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 29, p. 355 - 384, 2013.

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

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*, v. 13, n.1, p. 1 - 12, 2008.

KRAYCHETE, D.C.; GOZZANI, J.L.; KRAYCHETE, A.C. Dor neuropática - aspectos neuroquímicos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 58, p. 492 - 505, 2008.

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

MARKHAM, A.; PLOSKER, G. L.; GOA, K. L. Nicorandil: an update review of its use in ischaemic heart disease with emphasis on its cardioprotective effects. *Drugs*, v. 60, p. 955 - 974, 2000.

MATERAZZI, S.; FUSI, C.; BENEMEI, S.; PEDRETTI, P.; PATACCHINI, R.; NILIUS, B.; PRENEN, J.; CREMINON, C.; GEPPETTI, P.; NASSINI, R. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, v. 463, p. 561 - 569, 2012.

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

MATSUMOTO, M.; INOUE, M; HALD, A.; XIE, W.; UEDA, H. Inhibition of paclitaxel-induced a-fiber hypersensitization by gabapentin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 318, p. 735 - 740, 2006.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428 - 435, 2008.

MICHEL, T. Tratamento da isquemia cardíaca. *Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica*. 11^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. Cap. 31, p. 435 - 755.

MICKLE, A.D.; SHEPHERD, A.J.; MOHAPATRA, D.P. Nociceptive TRP channels: sensory detectors and transducers in multiple pain pathologies. *Pharmaceuticals*, v. 9, p. 1 - 26, 2016.

MONCADA S.; PALMER R. M.; HIGGS E. A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, p. 109 - 142, 1991.

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, p. 18 - 25, 2011.

MUDDULURU, G.; WALTHER, W.; KOBELT, D.; DAHLMANN, M.; TREESE, C.; ASSARAF, Y.G.; STEIN, U. Repositioning of drugs for intervention in tumor progression and metastasis: Old drugs for new targets. *Drug Resistance Updates*, v. 26, p. 10 - 27, 2016.

NAZEMIAN, V.; SHADNOUSH, M.; MANAHEJI, H.; ZARINGHALAM, J. Probiotics and Inflammatory Pain: A literature review study. *Middle East Journal of Rehabilitation and Health*, v. 3, p. 1 - 11, 2016.

NICKEL, F.T.; SEIFERT, F.; LANZ, S.; MAIHÖFNER, C. Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*, v. 22, p. 81 - 91, 2012.

NIETO, F.R.; CENDÁN, C.M.; FERNÁNDEZ, C.S.; COBOS, E.J.; ENTRENA, J.M.; TEJADA, M.A.; ZAMANILLO, D.; VELA, J.M.; BAEYENS, J.M. Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *The Journal of Pain*, v. 13, p. 1107 - 1121, 2012.

NIETO, F.R.; ENTRENA, J.M.; CENDÁN, C.M.; DEL POZO, E.; VELA, J.M.; BAEYENS, J.M. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. *Pain*, v. 137, p. 520 - 531, 2008.

O'CONNOR, A.B.; DWORKIN, R.H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *The American Journal of Medicine*, v. 122, p. 22 - 32, 2009.

OLIVEIRA, A.S.B.; GABBAI, A.A. Therapeutic approach of neuropathic pain in neurological clinic. *Revista Neurociências*, v. 6, p. 87 - 95, 1998.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A. Is repositioning of drugs a viable alternative in the treatment of tuberculosis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 275 - 283, 2013.

PANCZYK, K.; GOLDA, S.; WASZKIELEWICZ, A.; ZELASZCZYK, D.; GUNIA-KRZYZAK, A.; MARONA, H. Serotonergic system and its role in epilepsy and neuropathic pain treatment: a review based on receptor ligands. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, p. 1723 - 1740, 2015.

PARVATHY, S.S.; MASOCHA, W. Coadministration of indomethacin and minocycline attenuates established paclitaxel-induced neuropathic thermal hyperalgesia: Involvement of cannabinoid CB₁ receptors. *Scientific Reports*, v. 10541, p. 1 - 6, 2015.

PISANO, U.; DEOSARAN, J.; LESLIE, S.J.; RUSHWORTH, G.F.; STEWART, D.; FORD, I.; WATSON, A.J.M. Nicorandil, gastrointestinal adverse drug reactions and ulcerations: A systematic review. *Advances in Therapy*, v. 33, p. 320 - 344, 2016.

POLOMANO, R.C.; MANNES, A.J.; CLARK, U.S.; BENNETT, G.J. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*, v. 94, p. 293 - 304, 2001.

RAIMUNDO, A.K.S.; SOUSA, L.A.; SILVEIRA, R.F.; CERQUEIRA, M.C.D.; RODRIGUES, J.; DINI, P.D. Dosagem de serotonina sistêmica após aplicação da eletroestimulação nervosa transcutânea (TENS). *Fisioterapia em Movimento*, v. 22, n. 3, p. 365 - 374, 2009.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. O pâncreas endócrino e o controle da glicemia. *Farmacologia*. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. Cap. 14, p. 434 - 449.

REIS, F.J.; ROCHA, N.P. Long term analgesic effect of dipyron on the persistent hyperalgesia induced by chronic constriction injury of sciatic nerve in rats: involvement of nitric oxide. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, p. 513 - 522, 2006.

RESENDE, M.A.C.; NASCIMENTO, O.J.M.; RIOS, A.A.S.; QUINTANILHA, G.; CEBALLOS, L.E.S.; ARAÚJO, F.P. Perfil da dor neuropática: a propósito do exame neurológico mínimo de 33 pacientes. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 60, p. 144 - 153, 2010.

RIGO, F.K.; DALMOLIN, G.D.; TREVISAN, G.; TONELLO, R.; SILVA, M.A.; ROSSATO, M.F.; KLAFKE, J.Z.; CORDEIRO, M.N.; JUNIOR, C.J.C.; MONTIJO, D.; GOMEZ, M.V.; FERREIRA, J. Effect of ω -conotoxin MVIIA and Phc1 β on paclitaxel-induced acute and chronic pain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 114, p. 114 - 115, 2013.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 57, p. 94 - 105, 2007.

ROCHA, F.A.C.; ROCHA, J.C.S; PEIXOTO, M.E.B.; JANCAR, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 43, p. 206 - 217, 2003.

ROMERO-SANDOVAL, E. A.; CURROS-CRIADO, M. M.; GAITAN, G. Nitroparacetamol (NCX-701) and pain: First in a series of novel analgesics. *CNS Drug Reviews*, v. 13, p. 279 - 295, 2007.

ROMERO-SANDOVAL, E. A.; MAZARIO, J.; HOWAT, D.; HERRERO, J. F. NCX-701 (nitroparacetamol) is an effective antinociceptive agente in rat withdrawal reflexes and wind-up. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, p. 1556 - 1562, 2002.

ROWBOTHAM, M.C.; TWILLING, L.; DAVIES, P.S.; REISNER, L.; TAYLOR, K.; MOHR, D. Oral opioid therapy for chronic peripheral and central neuropathic pain. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, p. 1223 - 1232, 2003.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 3680 - 3685, 2004.

SAKAI, K.; AKIMA, M.; SAITO, M.; MATSUBARA, S. Nicorandil metabolism in rat myocardial mitochondria. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 35, p. 723 - 728, 2000.

SCHESTATSKY, P. Definition, diagnosis and treatment of neuropathic pain. *Revista HCPA*, v. 28, p. 177 - 87, 2008.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SIMPSON, D.; WELLINGTON, K. Nicorandil: A review of its use in the management of stable angina pectoris, including high-risk patients. *Drugs*, v. 64, p. 1941 - 1955, 2004.

SMITH, S.B.; CRAGER, S.E.; MOGIL, J.S. Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: Responses in 10 inbred mouse strains. *Life Sciences*, v. 74, p. 2593 - 2604, 2004.

SOARES, A.C.; LEITE, R.; TATSUO, M.A.K.F.; DUARTE, I.D.G. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *European Journal of Pharmacology*, v. 400, p. 67 - 71, 2000.

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Research*, v. 897, p. 9 - 19, 2001.

ŚWIEBODA, P.; FILIP, R.; PRYSTUPA, A.; DROZD, M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 1, p. 2 - 7, 2013.

THANGAMANI, D.; EDAFIOGHO, I.O.; MASOCHA, W. The anticonvulsant enamione e139 attenuates paclitaxel-induced neuropathic pain in rodents. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1 - 8, 2013.

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, p. 167 - 184, 2010.

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, p. 8 - 16, 2013.

WARD, S.J.; RAMIREZ, M.D.; NEELAKANTAN, H.; WALKER, E.A. Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. *Anesthesia & Analgesia*, v. 113, p. 947 - 950, 2011.

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

ZHANG, D.; YANG, R.; WANG, S.; DONG, Z. Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 8, p. 279 - 284, 2014.

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