

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

MARCELA DE MOURA GARCIA BINI DUTRA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO NICORANDIL E SEUS POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO**

Belo Horizonte – MG

2012

MARCELA DE MOURA GARCIA BINI DUTRA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO NICORANDIL E SEUS POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO**

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

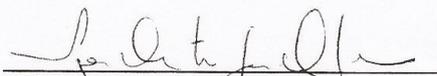
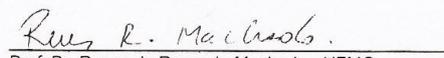
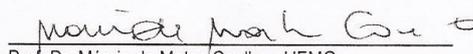
Orientador: Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho

Belo Horizonte

2012

FOLHA DE APROVAÇÃO**MARCELA DE MOURA GARCIA BINI DUTRA****"Atividade antinociceptiva de nicorandil e seus
possíveis mecanismos de ação"**

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e quatro de fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA
Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte - UFMG
Prof. Dr. Renes de Resende Machado - UFMG
Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho - UFMG

Dedico o grau de Mestre

Aos meus pais, Ivan e Jane Bini, que sempre acreditaram na minha inteligência.

E a você, leitor, que “perdeu” um pouco do seu tempo com meu humilde trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos alicerces de minha vida: Deus e meus maravilhosos pais.

Ao alicerce do meu futuro: Gil, meu melhor companheiro.

Ao alicerce de minhas ideias: Prof. Márcio, o melhor orientador que poderia ter.

Aos alicerces do meu trabalho: Todos os queridos amigos do laboratório de Farmacologia da FaFar – Dri, em especial, por me ajudar tanto –, Elias, Adelaide, Batista, Isabela e Prof. Angelo, pelas colaborações essenciais.

Ao alicerce financeiro: CNPq/CAPES, por permitir dedicação exclusiva ao meu projeto.

Aos alicerces de minha força: Dê, pela incondicional amizade; aos professores Armando, Sheila e Vicente, pelos conselhos e apoio.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos desprezam a sabedoria e a instrução”. (Prov.1:7)

RESUMO

Recentemente, os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório induzidos pela nicotinamida e por outros derivados de vitaminas do complexo B foram demonstrados em modelos experimentais de dor e inflamação. Estruturalmente, o nicorandil (nitrato de 2-nicotinamidoetil) é um composto caracterizado pela nicotinamida acoplada a um radical doador de óxido nítrico (NO). O nicorandil é clinicamente usado no tratamento de pacientes com *angina pectoris* e tem a capacidade de liberar NO e abrir canais para K⁺ ATP-dependentes. O interesse em investigar os efeitos induzidos pelo nicorandil em modelos experimentais de dor e inflamação resulta da observação de que a nicotinamida, bem como compostos que liberam NO, apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. Assim, os efeitos induzidos por nicorandil (50, 100 ou 150 mg/Kg, *p.o.*, -1 h), doses equimolares de N-(2-hidroxietil) nicotinamida (NHN), o seu principal metabólito oxidado, ou nicotinamida, foram avaliados no modelo de nocicepção induzida por formaldeído (0,92%, 20 µL, *s.c.*) em camundongos Swiss machos (25-30 g). Somente o primeiro induziu efeito antinociceptivo, atenuando a segunda fase da resposta nociceptiva, nas doses avaliadas. Tal efeito não foi observado após a administração local de nicorandil (125, 250 ou 500 µg/pata, *i.pl.*, -20 min). A atividade antinociceptiva do nicorandil não foi associada a comprometimento da atividade motora avaliada na haste girante (14 rpm, 2 min). A administração prévia ao nicorandil de glibenclamida (30 ou 60 mg/Kg, *p.o.*, -1 h), naltrexona (2 ou 5 mg/Kg, *i.p.*, -30 min) ou ODQ (0,5; 1 ou 2 mg/Kg, *i.p.*, -30 min) foi realizada para investigar possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do fármaco. Os resultados indicam a participação de receptores opioides, mas não de canais para potássio ATP-dependentes. Para avaliar a duração do efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil, o fármaco foi administrado *p.o.* 0,5; 1; 2; 3 ou 4 h antes da injeção de formaldeído. A atividade antinociceptiva do nicorandil foi observada quando o fármaco foi administrado entre 0,5 e 2 h antes da injeção de formaldeído. Após a administração *p.o.* do nicorandil (50 mg/kg), as concentrações plasmáticas máximas desse fármaco (30.916 ng/mL) e do seu principal metabólito (NHN; 16.8181 ng/mL) foram observadas 0,63 e 4 h, respectivamente, mas as concentrações plasmáticas da nicotinamida oscilaram entre 1.400 e 3.300 ng/mL e não diferiram daquela encontrada no plasma de animais não tratados. Concluindo, os resultados indicam que o nicorandil apresenta atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção induzida por formaldeído em camundongos. Essa atividade não é mediada pela nicotinamida ou pelo NHN. Receptores opioides medeiam a atividade antinociceptiva do nicorandil, mas o papel da via NO-cGMP parece ter importância parcial e requer mais estudos. Os resultados indicam que o nicorandil, fármaco em uso clínico em alguns países, pode representar uma alternativa importante na farmacoterapia de pacientes que apresentam condições dolorosas diversas 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, NO, formalina, dor, nocicepção.

ABSTRACT

Recently, the antinociceptive and anti-inflammatory activities of nicotinamide and other derivatives of the vitamin B complex have been demonstrated in experimental models of pain and inflammation. Structurally, nicorandil (2-nicotinamidoethyl nitrate) is a compound characterized by nicotinamide coupled to a nitric oxide (NO) donor. Nicorandil, which is clinically used to treat patients with *angina pectoris*, releases NO and opens ATP-dependent K⁺ channels. The interest in investigating the effects induced by nicorandil in experimental models of pain and inflammation results from the observation that nicotinamide, as well as compounds that release NO, exhibit antinociceptive and anti-inflammatory activities. Thus, the effects induced by nicorandil (50, 100 and 150 mg/Kg, *p.o.*, -1 h) or by equimolar doses of N-(2-hydroxyethyl) nicotinamide (NHN), its principal oxidized metabolite, or nicotinamide, were evaluated in the model of nociception induced by formaldehyde (0.92%, 20 µl, *s.c.*) in male Swiss mice (25-30 g). Only the first one induced antinociceptive effect, reducing the second phase of nociceptive response. Such effect was not observed after the local administration of nicorandil (125, 250 or 500 µg/paw, *i.pl.*, -20 min). The antinociceptive effect of nicorandil was not associated with motor activity impairment evaluated in the rotarod apparatus (14 rpm, 2 min). The prior administration to nicorandil of glibenclamide (30 or 60 mg/Kg, *p.o.*, -1 h), naltrexone (2 or 5 mg/Kg, *ip.*, -30 min) or ODQ (0.5; 1 or 2 mg /Kg, *i.p.*, -30 min) was performed to investigate possible mechanisms involved in the antinociceptive activity of the drug. The results indicate the participation of opioid receptors, but not of ATP-dependent K⁺ channels. To evaluate the duration of antinociceptive effect induced by nicorandil, the drug was administered *p.o.* 0.5, 1, 2, 3 or 4 h before formaldehyde. The antinociceptive activity of nicorandil was observed when the drug was administered between 0.5 and 2 h before the injection of formaldehyde. After *p.o.* administration of nicorandil (50 mg/kg), peak plasma concentrations of this drug (30,916 ng/mL) and its primary metabolite (NHN; 16,181 ng/mL) were observed 0.63 and 4 h, respectively, but plasma concentrations of nicotinamide oscillated between 1,400 and 3,300 ng/mL and did not differ from that found in the plasma of untreated animals. In conclusion, the results indicate that nicorandil exhibits antinociceptive activity in the model of nociception induced by formaldehyde in mice. This activity is not mediated by nicotinamide or by NHN. Opioid receptors mediate the antinociceptive activity of nicorandil, but the role of NO-cGMP pathway seems partially important and requires more studies. The results indicate that nicorandil, a drug in clinical use in some countries, may represent an important alternative in the pharmacotherapy of patients with various painful conditions and serve as a stimulus for performing pre-clinical and clinical studies to investigate its potential use as an analgesic.

Keywords: Nicorandil, nicotinamide, NO, formalin, pain, nociception.

LISTA DE FIGURAS

1 Estruturas químicas de algumas vitaminas do complexo B.....	21
2 Estruturas químicas dos compostos da vitamina B ₃	22
3 Reação catalisada pela NO sintase e formação da guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a partir da guanosina trifosfato, estimulada pelo NO.....	25
4 Estruturas químicas do nicorandil (A) e da nicotinamida (B).....	28
5 Metabólitos do nicorandil identificados na urina de humanos e animais experimentais.....	29
6 Aparato utilizado para avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	36
7 Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelo nicorandil, pelo seu metabólito denitrado (NHN) ou pela nicotinamida sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	36
8 Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos por nicorandil ou diclofenaco, após tratamento prévio com glibenclamida, sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	37
9 Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelo nicorandil ou pelo diclofenaco, após tratamento prévio com naltrexona ou ODQ, sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	37
10 Escala temporal de avaliação dos efeitos locais induzidos pelo nicorandil ou pela dipirona sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	38

11 Haste girante utilizada para avaliar a atividade motora de camundongos.....	39
12 Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelo nicorandil ou fenobarbital sobre a coordenação motora.....	39
13 (A) Efeitos induzidos pelo nicorandil ou pela nicotinamida (50, 100 e 150 mg/kg, <i>p.o.</i> , -1 h); e (B) Efeitos induzidos pelo nicorandil (12,5, 25 ou 50 mg/kg, <i>p.o.</i> , -1 h) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído.....	42
14 Efeito induzido pelo NHN (doses correspondentes a 50, 100 e 150 mg/kg do nicorandil) sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	43
15 Efeitos induzidos pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) ou pelo fenobarbital (40 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante.....	44
16 Efeitos induzidos pelo nicorandil (50 mg/kg, <i>p.o.</i>), administrado em diferentes momentos (0,5; 1; 2; 3 ou 4 h antes), sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído.....	45
17 Concentrações plasmáticas do nicorandil, do NHN ou da nicotinamida observadas após a administração do nicorandil (50 mg/kg, <i>p.o.</i>).....	46
18 Efeito induzido pela glibenclamida (30 ou 60 mg/kg, <i>p.o.</i>) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil (50 mg/kg, <i>p.o.</i>).....	47
19 Efeito induzido pela glibenclamida (30 ou 60 mg/kg, <i>p.o.</i>) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo diclofenaco (50 mg/kg, <i>p.o.</i>).....	47

20 Efeito induzido pela naltrexona (2 ou 5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil (50 mg/kg, p.o.).....	48
21 Efeito induzido pelo ODQ (0,5; 1 ou 2 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil (50 mg/kg, p.o.).....	49
22 Efeito induzido pela administração i.pl. do nicorandil (125, 250 ou 500 µg/pata, -20 min) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído.....	50
23 Efeitos induzido pela administração i.pl. da dipirona (50, 100 ou 150 µg/pata, -20 min) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	-	Ácido acetilsalicílico
AINE	-	Anti-inflamatório não-esteróide
ATP	-	Adenosina trifosfato
C _{max}	-	Concentração máxima
COX	-	Ciclooxigenase
CMC	-	Carboximetilcelulose
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
EUA	-	Estados Unidos da América
IASP	-	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IONA	-	<i>Impact of Nicorandil in Angina</i>
i.p.	-	Intraperitoneal
i.pl.	-	Intraplantar
i.t.	-	Intratecal
GC	-	Guanilato ciclase
GCa	-	Guanilato ciclase ativada
GMPc	-	Guanosina monofosfato cíclico
n.	-	Número
NAD ⁺	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP ⁺	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NANC	-	Não-adrenérgico e não-colinérgico
NHN	-	N-(2-hidroxietil) nicotinamida
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
NO	-	Óxido nítrico
NOS	-	Óxido nítrico sintase
ODQ	-	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
PG	-	Prostaglandina
p.	-	Página

<i>p.o.</i>	-	<i>per os</i>
s.c.	-	Subcutânea
SNC	-	Sistema Nervoso Central
STC	-	Síndrome do túnel do carpo
$T_{1/2}$	-	Tempo de meia-vida
T_{\max}	-	Tempo de concentração máxima
UFMG	-	Universidade Federal de Minas Gerais
v.	-	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Dor e inflamação.....	16
1.2 Impacto da dor sobre a qualidade de vida.....	18
1.3 Novas funções para fármacos em uso.....	19
1.4 Óxido nítrico (NO) e o nicorandil.....	24
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVO GERAL.....	32
3.1 Objetivos específicos.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Animais experimentais.....	33
4.2 Drogas.....	33
4.3 Preparo das soluções e suspensões.....	34
4.4 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos.....	35
4.5 Avaliação da atividade motora de camundongos no modelo da haste girante.....	38
4.6 Quantificação do nicorandil, do NHN e da nicotinamida no plasma de camundongos por LC-MS/MS.....	40
4.7 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Efeito induzido pelo nicorandil ou por doses equimolares do seu principal metabólito ou da nicotinamida sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	42
5.2 Concentrações plasmáticas do nicorandil, do seu principal metabólito e da nicotinamida após a administração do nicorandil.....	45

5.3 Efeitos induzidos pela glibenclamida, pela naltrexona e pelo ODQ sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil.....	47
5.4 Efeito induzido pela administração intraplantar de nicorandil sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	50
6 DISCUSSÃO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e inflamação

Hipócrates, filósofo grego, no século IV A.C., afirmava que o alívio da dor era uma obra divina. A dor, o sintoma associado a processos patológicos que mais causa sofrimento ao ser humano, é definida pela “International Association for the Study of Pain” (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. É uma modalidade sensorial, sempre subjetiva, resultante da integração de vários níveis neurais – desde a detecção do estímulo pelos receptores periféricos até o seu processamento no sistema nervoso central (SNC). Em geral, a dor é acompanhada por um desejo instintivo de que o estímulo nocivo seja interrompido e evitado. A interação entre inúmeros fatores sensoriais, afetivos e cognitivos e o objetivo da manutenção da integridade física do indivíduo distinguem a dor de outras experiências sensoriais (RAINVILLE, 2002). Segundo Scholz e Woolf (2002), a dor pode ser dividida em quatro categorias. Uma delas é a dor nociceptiva, resultante da ativação de nociceptores do tipo A δ e C por estímulos nocivos térmicos, químicos ou mecânicos. Outra categoria é a dor inflamatória que, em geral, se relaciona à lesão tecidual. Mediadores inflamatórios, tais como aminas, cininas, prostanoídes, purinas e citocinas podem ativar ou sensibilizar nociceptores, levando a alterações funcionais de neurônios no SNC. A terceira categoria é a dor neuropática, que decorre de lesões ou disfunções do sistema nervoso, tanto central quanto periférico. Condições como síndrome do túnel do carpo (STC), lesão da medula espinhal ou acidente vascular cerebral podem causar dor neuropática, que é uma combinação de déficits neurológicos. Por fim, a última categoria é a dor funcional, menos compreendida que as demais, que tem como exemplos a fibromialgia e a cefaleia tensional.

Entre as quatro categorias de dor, a inflamatória é a mais comum e a que leva o maior número de pacientes a buscar alternativas para o seu alívio. A inflamação é uma reação complexa no sistema conjuntivo vascularizado que envolve plasma, células e proteínas do sangue circulante, vasos sanguíneos e

constituintes da matriz extracelular. A inflamação manifesta-se pelo aumento do suprimento sanguíneo para a área afetada e aumento da permeabilidade vascular, o que permite a difusão dos mediadores inflamatórios e migração de leucócitos dos capilares para os tecidos circulantes e o seu acúmulo local. Esse processo é, essencialmente, uma resposta defensiva e protetora com o objetivo de eliminar ou isolar o agente causador da lesão e, também, conduzir a uma série de eventos que contribuem para a regeneração ou cicatrização do tecido lesionado. Dependendo da intensidade e persistência do estímulo inflamatório, essa cascata de eventos pode prolongar e induzir lesão tecidual pela liberação exacerbada de enzimas, mediadores inflamatórios e radicais livres de oxigênio (COLLINS, 1999). A utilização de anti-inflamatórios, nesses casos, é útil para limitar o desenvolvimento acentuado da inflamação e a cronificação desse processo.

A inflamação pode ocorrer como um processo agudo ou crônico. A inflamação aguda é de duração relativamente curta, pode permanecer por minutos, horas ou poucos dias, e suas principais características são exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas – ocasionando o edema – e migração de leucócitos. Na fase inicial da inflamação, os neutrófilos são os leucócitos prevalentes. A inflamação crônica é de longa duração e está intimamente associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual. Muitos fatores modificam o curso temporal e o aspecto histológico da resposta inflamatória. Existe uma ampla variedade de moléculas, entre essas eicosanoides, citocinas, cininas, proteínas de fase aguda e anticorpos, produzidas por vários tipos de células ou derivadas de precursores plasmáticos, que têm suas concentrações elevadas rapidamente durante o processo inflamatório (COLLINS, 1999). Algumas delas, como a proteína C reativa, têm aplicação diagnóstica em medicina laboratorial.

1.2 Impacto da dor sobre a qualidade de vida

Uma vez que a dor associada à inflamação ou a outras condições patológicas representa o sintoma que mais causa desconforto aos pacientes, não é surpreendente constatar que esse sintoma representa o principal motivo para a procura por serviços de saúde. Nesse contexto, diferentes abordagens terapêuticas, dentro da medicina tradicional ou não, têm sido usadas com o objetivo de eliminar ou minimizar o sofrimento decorrente da dor. Uma das abordagens mais comuns é a farmacoterapia. Entre as diferentes classes farmacológicas ou grupos terapêuticos que têm sido usados com o objetivo de aliviar a dor, as alternativas mais convencionais são os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) e os analgésicos opioides. Entretanto, para diversas condições dolorosas, esses fármacos são ineficazes e, por isso, alguns fármacos, originalmente aprovados para outras finalidades terapêuticas, têm sido usados para o alívio da dor associada ou não a condições inflamatórias. Antidepressivos tricíclicos (principalmente a amitriptilina), anticonvulsivantes (carbamazepina, fenitoína, gabapentina, topiramato), agonistas alfa-2 adrenérgicos (clonidina) e antagonistas de receptores NMDA têm sido utilizados para o alívio de dores neuropáticas (BROWER, 2000; GALVÃO, 2005; KAMIBAYASHI & MAZE, 2000; PARK & MOON, 2010). A clonidina também tem aplicação como adjuvante anestésico (CHIZH & HEADLEY, 2005; KAMIBAYASHI & MAZE, 2000; SMANIA & GARCIA, 2005) e antidepressivos tricíclicos são usados na profilaxia de enxaqueca, fibromialgia, neuropatia diabética e lombalgia persistente por mais de três meses (CHAN et al., 2009; SILVA et al., 2008).

O manejo adequado de pacientes com condições dolorosas tem um papel importante em todo sistema de saúde, tendo em vista a elevada prevalência da dor na população. Nos EUA, 15 – 30% dos indivíduos relatam algum tipo de dor crônica e a quase totalidade dos pós-operados sofre com dores agudas (BONOMI et al., 2000). No Brasil, uma das estimativas é de que entre 5 – 30% da população seja afetada por lombalgia (MALATEAUX et al., 2011). Outro fator preocupante é que nem sempre o paciente com condições dolorosas recebe tratamento, e quando o recebe, não quer dizer que esse seja eficaz. Lipton e

colaboradores (2001) relataram que 41% dos indivíduos com enxaqueca na população norte-americana foram tratados com medicamentos prescritos, mas que apenas 29% dos pacientes relataram alguma melhora com o tratamento.

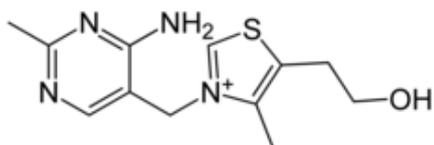
Para se imaginar a magnitude dos gastos associados à farmacoterapia da dor, apenas as vendas de analgésicos livres de prescrição somam mais de três bilhões de dólares e os prescritos acrescentam outros 100 bilhões por ano somente nos Estados Unidos (BROWER, 2000). Nesse país, outros 61 bilhões de dólares são perdidos anualmente devido à redução da produtividade dos trabalhadores, decorrente principalmente de cefaleia, artrite, lombalgia e dores músculo-esqueléticas diversas (STEWART, 2003).

1.3 Novas funções para fármacos em uso

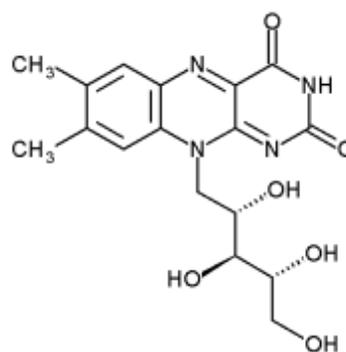
Nos últimos anos, a investigação farmacológica de novos compostos mostrou resultados insuficientes para compensar os grandes investimentos, resultando numa relação extremamente desfavorável entre custo e benefício. Em virtude disso, no campo da pesquisa de fármacos e medicamentos, houve uma concentração de esforços e investimentos na caracterização de novas funções para fármacos em uso como uma alternativa ao processo longo e dispendioso de desenvolvimento de novos fármacos. Essa abordagem tem se mostrado vantajosa para a indústria farmacêutica, uma vez que parâmetros como segurança e perfil farmacocinético de fármacos em uso clínico já estão previamente estabelecidos (CHONG & SULLIVAN, 2007).

Nesse contexto, podemos citar derivados da vitamina B, complexo formado por 11 vitaminas (tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxina, biotina, cianocobalamina, ácido fólico, inositol, colina e ácido para-aminobenzoico; Figura 1). A correção de deficiências é seu principal uso terapêutico, mas esses derivados têm sido alvos de investigação de novas atividades farmacológicas. Essas novas funções são relatadas na literatura e

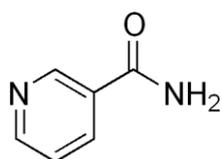
suportam a ideia de que algumas destas vitaminas apresentam atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Estudos clínicos demonstraram que altas doses da riboflavina (vitamina B₂) são úteis na profilaxia da enxaqueca, reduzindo a frequência e a duração das crises (BOEHNKE et al., 2004; SCHOENEN et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que a deficiência de uma ou mais vitaminas do complexo B está, muitas vezes, associada à ocorrência de neuropatias e dor. É o caso da STC, caracterizada pela perda de força e sensibilidade das mãos, parestesia e dor que pode se estender do punho ao ombro. Ellis e colaboradores (1982) detectaram deficiência da piridoxina em pacientes que desenvolveram essa síndrome, sendo que os sintomas foram aliviados pela correção da deficiência. Por sua vez, Folkers e colaboradores (1984) descreveram um caso clínico no qual a STC estava associada à deficiência da piridoxina e da riboflavina. O tratamento desse paciente com essas vitaminas reduziu os sinais e sintomas de forma rápida e eficaz e eliminou a necessidade de intervenção cirúrgica.



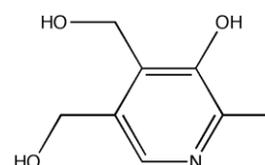
Tiamina (Vitamina B₁)



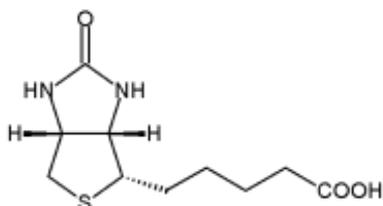
Riboflavina (Vitamina B₂)



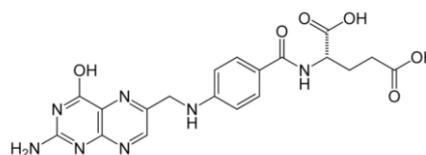
Nicotinamida (Vitamina B₃)



Piridoxina (Vitamina B₆)



Biotina (Vitamina B₇)



Ácido fólico (Vitamina B₉)

Figura 1 – Estruturas químicas de algumas vitaminas do complexo B.

Estudos pré-clínicos suportam resultados obtidos em estudos clínicos. Assim, foram demonstradas as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da riboflavina em diferentes modelos experimentais de nocicepção, edema, febre e formação de tecido fibrovascular (BERTOLLO et al., 2006). A associação de tiamina, piridoxina e cianocobalamina também induz efeito antinociceptivo nos modelos da placa quente, das contorções abdominais induzidas por ácido acético e benzoquinona e da resposta nociceptiva induzida por formaldeído (BARTOSZYK & WILD, 1990; FRANÇA et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 1990), bem como em modelos experimentais de dor neuropática induzida por constrição de nervos (WANG et al., 2005) e por diabetes (JOLIVALT et al., 2009). Além disso, as associações de vitaminas do complexo B aumentam o efeito antinociceptivo induzido por AINEs (BARTOSZYK & WILD, 1989; REYES-GARCÍA et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 1990). Esses estudos indicam que o uso concomitante de vitaminas do complexo B e AINEs poderia permitir a redução das doses desses anti-inflamatórios e, conseqüentemente, da incidência de reações adversas.

Outra vitamina do complexo B que vem sendo estudada é a vitamina B₃, que possui duas substâncias como representantes: a nicotinamida (ou niacinamida) e o ácido nicotínico (ou niacina), representadas na Figura 2.



Figura 2 – Estruturas químicas dos compostos da vitamina B₃.

Essas vitaminas atuam no organismo como precursoras das coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺) que, por sua vez, atuam conjuntamente com várias outras enzimas, catalisando reações de oxirredução envolvendo aceção e doação de elétrons e hidrogênio, essenciais para o processo respiratório de mamíferos (MARCUS & COULSTON, 2001).

Embora possuam estruturas bastante semelhantes e atuem de maneira idêntica como vitaminas, o ácido nicotínico e a nicotinamida têm diferentes funções farmacológicas e perfis toxicológicos. O ácido nicotínico, por exemplo, é o mais antigo dos fármacos utilizados no tratamento de pacientes com dislipidemias e o mais versátil, induzindo alterações favoráveis de todos os parâmetros lipídicos (ALTSCHUL et al., 1955; KNOPP, 1998). As doses utilizadas para o tratamento de pacientes com dislipidemias são altas, podendo chegar a 6 g por dia, sendo que a necessidade diária dessa vitamina é de aproximadamente 50 mg por dia. Foi demonstrado que a nicotinamida, embora não seja eficaz no tratamento de pacientes dislipidêmicos, pode ser útil na prevenção do *diabetes mellitus* tipo 1. Este tratamento foi proposto a partir da observação de que altas doses de nicotinamida previnem o diabetes induzido por estreptozotocina em ratos. Além disso, a nicotinamida possui atividade protetora de células β pancreáticas (MASIELLO et al., 1990). Apesar dos resultados positivos obtidos em estudos pré-clínicos, a eficácia da nicotinamida na prevenção do diabetes mellitus tipo 1 em humanos ainda não foi bem estabelecida (GALE et al., 2004).

Outros estudos investigaram o efeito induzido pela nicotinamida em modelos experimentais de dor e inflamação. Foi demonstrada a atividade anti-inflamatória da nicotinamida em modelos de artrite induzida por peróxido cromato de potássio (MIESEL et al., 1995), pleurite (CUZZOCREA et al., 1999) e edema de pata (GODIN et al., 2011) induzidos por carragenina. É possível que essa atividade esteja associada à inibição da produção de mediadores inflamatórios, à infiltração leucocitária e à expressão do gene da ciclooxigenase-2 (COX-2) (PERO et al.,

1999). A nicotinamida também inibe a resposta nociceptiva induzida por formaldeído e por calor e a alodínia mecânica induzida por carragenina (GODIN et al., 2011).

1.4 Óxido nítrico (NO) e o nicorandil

Há muito tempo o NO foi conhecido e estudado pelos químicos por se tratar de um gás poluente atmosférico, mas recentemente ganhou grande importância fisiológica. O NO é uma molécula pequena e instável, responsável por sinalização celular nos sistemas cardiovascular e nervoso e por ser efetor da citotoxicidade no sistema imune, além de um dos mediadores da inflamação. O NO endógeno é produzido a partir da L-arginina pela família enzimática das NO sintases e ativa a guanilato ciclase solúvel, aumentando o conteúdo de GMPc intracelular (FIGURA 3). Na vasculatura promove o relaxamento da musculatura lisa, sendo que a liberação basal de NO pelas células endoteliais é determinante primário do tônus vascular em repouso. Além disso, a síntese aumentada do NO em resposta ao estresse de cisalhamento ou em resposta a outros agentes, resulta em vasodilatação. Furchgott e Zawadzki, em 1980, demonstraram que a integridade do endotélio era essencial para o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta pré-contraídos por norepinefrina e, poucos anos depois, descobriu-se que o NO era o responsável por esse efeito vasodilatador. Entretanto, muito antes, ainda no início do século XIX, a nitroglicerina (molécula doadora de NO) já era utilizada empiricamente no tratamento de pacientes com angina. No sistema nervoso, o NO atua como facilitador da transmissão neuronal (no encéfalo e na medula espinhal) e da citotoxicidade mediada por aminoácidos excitatórios. Também há demonstração clara de que o NO tem papel importante no processamento nociceptivo no SNC (MICHEL, 2006).

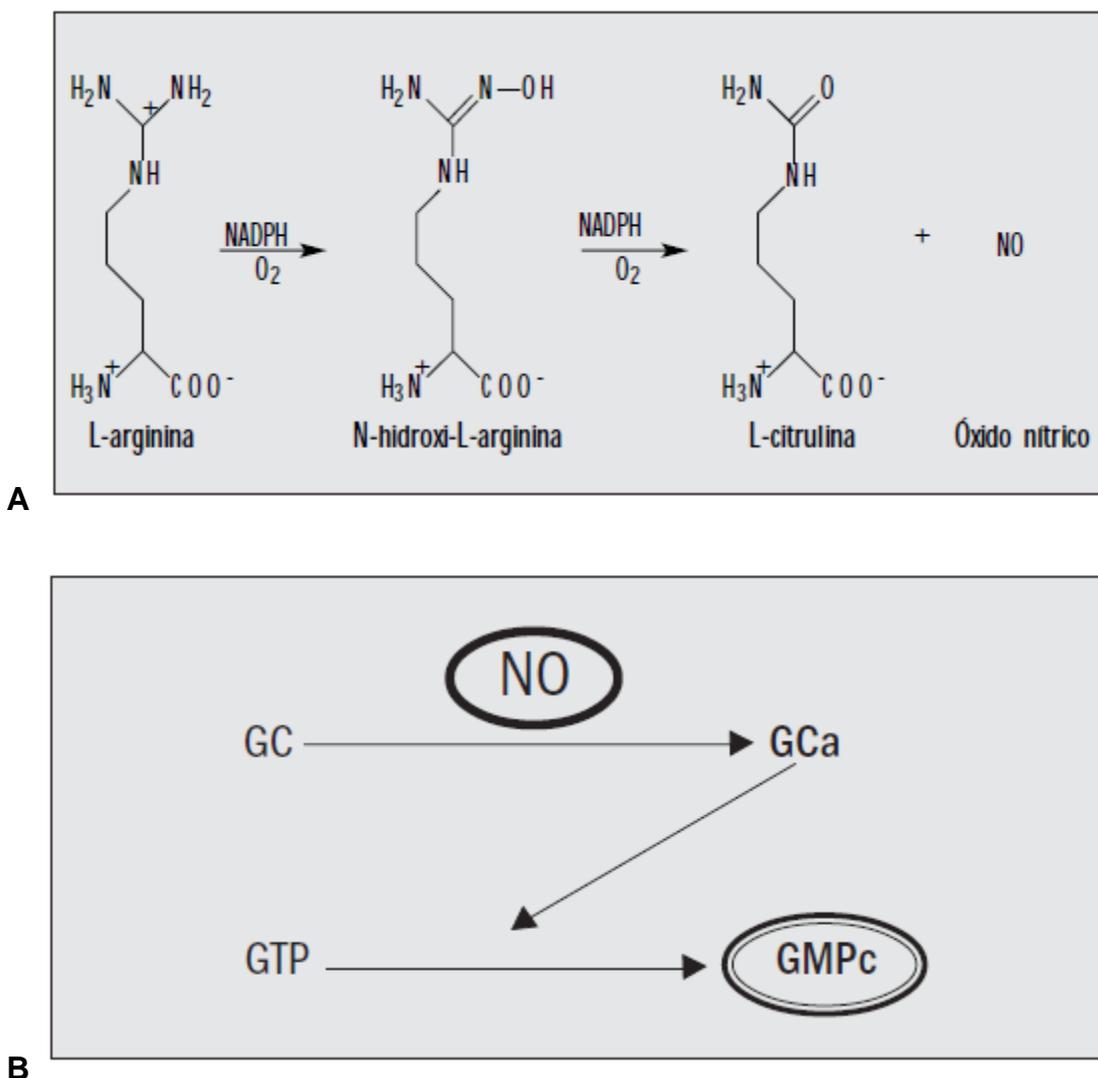


Figura 3 – Reação catalisada pela NO sintase (A) e formação da guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a partir da guanosina trifosfato, estimulada pelo NO (B). GC = guanilato ciclase; GCa = guanilato ciclase ativada (DUSSE et al., 2003)

O NO tem aplicações terapêuticas diretas (inalação do gás) ou indiretas (administração de moléculas doadoras de NO). A inalação de NO pode dilatar a vasculatura pulmonar de modo seletivo, com efeitos cardiovasculares desprezíveis, mas possui aplicação clínica bastante limitada, sendo usado somente em recém-nascidos com hipertensão pulmonar resistente. Moléculas como nitroglicerina, nitroprussiato de sódio, mono e dinitrato de isossorbida são clivadas *in vivo* liberando o NO. Esses fármacos são, há várias décadas, os medicamentos mais extensamente utilizados no tratamento de pacientes com

condições cardíacas isquêmicas, como a *angina pectoris*, emergências hipertensivas em geral e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (MICHEL, 2006; SIMON et al., 2006).

O NO contribui para o desenvolvimento de manifestações da resposta inflamatória, por promover a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, a produção de prostaglandinas (PGs) inflamatórias e a sensibilização de nociceptores. A NO sintase indutível (iNOS) é a principal isoforma da enzima envolvida em reações inflamatórias, sendo a expressão do seu gene aumentada por diferentes estímulos inflamatórios, incluindo várias citocinas (MONCADA et al., 1991; RAWLINGSON, 2003).

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. Dois grupos demonstraram que o nitroprussiato de sódio induz efeito anti-hiperalgésico em ratos no teste Randall-Selitto modificado (DUARTE et al., 1990; SOARES et al., 2000); outro grupo de pesquisadores demonstrou que uma outra droga doadora de NO, o SIN-1, induz efeito antinociceptivo em testes de alodínia mecânica e de retirada de cauda. Além disso, a ativação da via NO-GMPc é importante para a resposta nociceptiva de opioides como a morfina (DUARTE & FERREIRA, 1991; NOZAKI-TAGUSHI & YAMAMOTO, 1998). Entretanto, deve-se ressaltar que o papel específico desta molécula no processamento periférico da resposta nociceptiva não é completamente claro, uma vez que há estudos indicando que esse mediador, dependendo da sua concentração local ou do seu local de ação, pode induzir efeitos pró ou antinociceptivo (DUARTE et al., 1992; DUARTE & FERREIRA, 1991; PRADO et al., 2002).

A ligação de um radical doador de NO a estruturas químicas de fármacos anti-inflamatórios esteroides e AINEs (por meio de uma ligação éster) pode melhorar o seu perfil farmacológico, seja por meio do aumento da eficácia terapêutica ou da redução da ocorrência de reações adversas. Entre os fármacos que têm sido ligados a um doador de NO podem ser mencionados o ácido acetilsalicílico (AAS), o paracetamol, o naproxeno e a prednisolona. Os AINEs ligados a um radical doador de NO (NO-AINES) não somente exibem baixa toxicidade gástrica – reação indesejada e bastante freqüente entre pacientes que fazem uso desses fármacos – como também reduzem a ulceração induzida por causas diversas em modelos experimentais. O NO-paracetamol exibe um perfil hepatoprotetor, diferentemente do paracetamol que, em elevadas doses, pode causar toxicidade ao fígado (KEEBLE & MOORE, 2002). Nitrodiclofenaco (WALLACE et al., 1994) e nitronaproxeno (DAVIES et al., 1997) também induzem lesões gastrointestinais reduzidas quando comparadas aos fármacos originais. NO-AINES apresentam essa vantagem quanto à redução de efeitos adversos no trato gastrointestinal por reduzir a adesão de leucócitos e inibir caspases, o que diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias no local. Além disso, a própria molécula de NO, liberada ao longo do trato digestivo quando o fármaco é administrado via oral, promove a vasodilatação direta da mucosa, melhorando o fluxo sanguíneo, o que também contribui para evitar lesões no local (KEEBLE & MOORE, 2002).

Nessa linha, o nicorandil, ou nitrato de 2-nicotinamidoetil (Figura 4), é um doador de NO, amplamente aceito como um agente efetivo no tratamento de pacientes com doenças cardíacas isquêmicas, em especial, a *angina pectoris*. O nicorandil apresenta eficácia similar àquela do dinitrato de isossorbida e é uma opção terapêutica para pacientes refratários ao tratamento convencional (EL-MOSELBY et al., 2009; FRAMPTON et al., 1992). A estrutura química do nicorandil demonstra claramente que se trata da nicotinamida acoplada a um doador de NO. O nicorandil induz seus efeitos vasodilatadores por meio de dois mecanismos distintos. Um dos mecanismos envolve a estimulação da guanilato ciclase, que por sua vez aumenta as concentrações de GMPc na célula, que leva ao relaxamento do músculo liso vascular – mecanismo semelhante ao dos

nitratos clássicos. Outro mecanismo resulta da ativação de correntes para K^+ e consequente hiperpolarização da musculatura vascular, o que resulta em relaxamento de vasos (BARBATO, 2000; KUKOVETZ et al., 1992; YASUDA et al., 2001). Assim, o nicorandil tem duas grandes ações hemodinâmicas: causa dilatação venosa, reduzindo a pré-carga devido a uma atividade similar àquela de outros nitratos, e dilatação sistêmica, reduzindo a resistência vascular periférica e a pós-carga pela capacidade de promover a abertura de canais para K^+ ATP-dependentes (ARONSON, 2006).

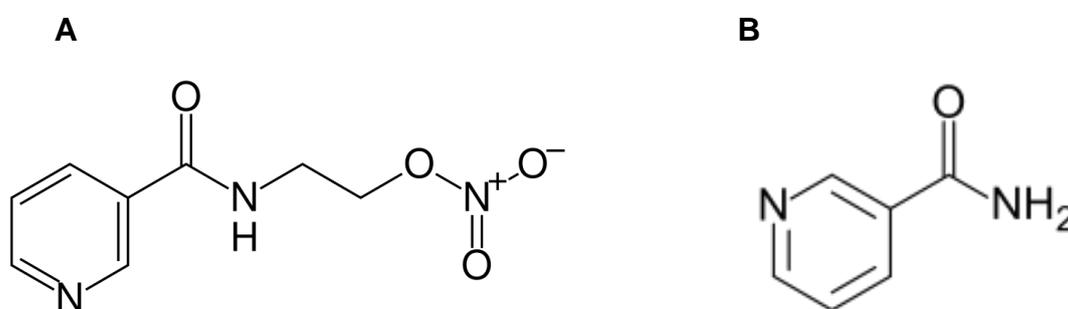


Figura 4 – Estruturas químicas do nicorandil (A) e da nicotinamida (B).

O nicorandil possui perfil farmacocinético relativamente simples, com absorção rápida e pico de concentração plasmática em torno de 30 min, sem se ligar a proteínas plasmáticas ou sofrer efeito de primeira passagem hepática. Há dois caminhos possíveis em sua biotransformação: denitração a seu metabólito principal N-(2-hidroxietil) nicotinamida (NHN; Figura 5) ou degradação de sua cadeia lateral, formando nicotinamida e seus posteriores metabólitos, que são eliminados majoritariamente pela urina (FRYDMAN, 1992; MARKHAM et al., 2000). Cerca de 60% dos metabólitos de nicorandil são eliminados na urina até 24 horas após a administração e apenas 1% do fármaco é eliminado na urina na sua forma inalterada (FRYDMAN et al., 1989; SIMPSON & WELLINGTON, 2004). A farmacocinética do nicorandil não é influenciada pela idade ou comprometimento da função renal. 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 (MARKHAM *et al.*, 2000).

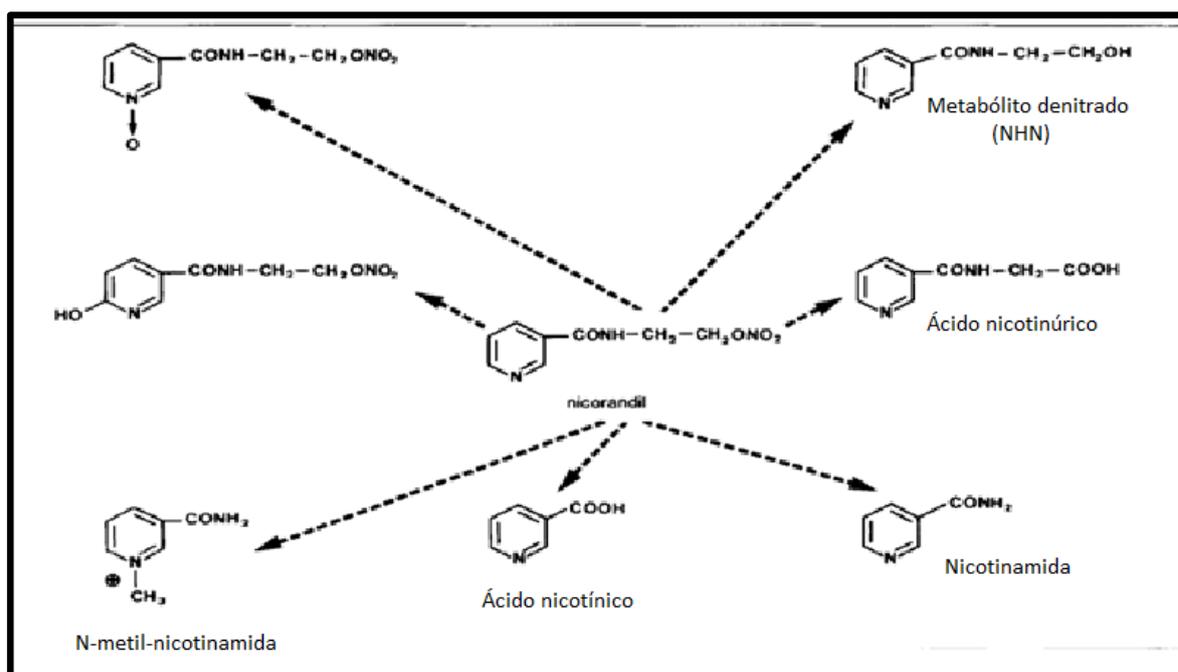


Figura 5 – Metabólitos do nicorandil identificados na urina de humanos e animais experimentais (Adaptado de Frydman *et al.*, 1989).

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). Comparado a outros fármacos como propranolol, anlodipino e diltiazem, o nicorandil induz reações adversas em uma extensão semelhante (29,8; 31,7 e 35,1%, respectivamente). Rubor e hipotensão postural também são relatados devido às suas propriedades vasodilatadoras (ARONSON, 2006). Entretanto, múltiplos

relatos na literatura ainda demonstram que ocorre, em um número pequeno de casos, ulcerações anal, oral, gastrointestinal e genital, cujas lesões são grandes, profundas, persistentes e não responsivas a nenhum tratamento, mas que cicatrizam rapidamente após suspensão do medicamento (ARONSON, 2006; EGRED, 2007; BHATTI et al., 2009). As doses usuais do nicorandil variam de 10 a 20 mg, duas vezes ao dia, mas podem ser aumentadas até 30 mg para obtenção do efeito terapêutico ou reduzidas para 5 mg quando o paciente se queixa de cefaleia.

O nicorandil está disponível no Japão desde 1984 e, atualmente, está licenciado também na Europa e na Austrália, aprovado para o uso na prevenção de *angina pectoris* crônica e no tratamento de pacientes com essa doença. O maior ensaio clínico já realizado com o nicorandil demonstrou redução de ocorrência de infarto não-fatal, hospitalização não planejada por dores no peito e morte por doença cardiovascular em 5126 pacientes com angina no Reino Unido (IONA Study Group, 2002). O seu amplo uso clínico em alguns países possibilitou que informações sobre a sua segurança sejam conhecidas e que, caso haja alguma nova indicação terapêutica, sua implantação efetiva na clínica seja uma etapa relativamente mais rápida e simples.

Os resultados de estudos clínicos e experimentais indicam que a nicotinamida pode ser um fármaco útil no tratamento de pacientes apresentando processos inflamatórios e pode apresentar eficácia em condições dolorosas. Além disso, a modificação molecular de fármacos de modo a transformá-los em doadores de NO, pode resultar em aumento das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Entretanto, estudos comparativos entre nicotinamida e seu correspondente doador de NO, o nicorandil, ainda não foram realizados até o momento. Tais estudos podem proporcionar resultados que contribuam para uma nova aplicação do nicorandil na terapêutica de condições patológicas inflamatórias ou dolorosas.

2 JUSTIFICATIVA

A investigação de novas aplicações terapêuticas para fármacos em uso clínico, com eficácia e segurança conhecidas, é uma vertente recente da pesquisa científica. Além disso, o acoplamento de um radical doador de NO a moléculas de fármacos pode melhorar seus perfis farmacocinético e farmacodinâmico. Estudos preliminares em nosso laboratório demonstraram as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de altas doses de nicotinamida. O acoplamento de um doador de NO à nicotinamida resulta em um fármaco conhecido, o nicorandil, que é utilizado em vários países há mais de uma década. A investigação das atividades do nicorandil em modelos experimentais de dor é importante para avaliar o potencial uso desse fármaco no tratamento de pacientes que apresentam condições inflamatórias e dolorosas.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito induzido pelo nicorandil em um modelo experimental de dor nociceptiva e inflamatória, bem como os possíveis mecanismos que contribuem para tal efeito.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Avaliar os efeitos induzidos pelo nicorandil, pelo seu principal produto de biotransformação (NHN) e pela nicotinamida no modelo experimental de dor nociceptiva e inflamatória em camundongos.

3.1.2 Avaliar se os efeitos induzidos pelo nicorandil são mediados pela ativação da via NO-cGMP-canais para K⁺-ATP-dependentes ou dos receptores opioides.

3.1.3 Determinar as concentrações plasmáticas do nicorandil, do seu principal produto de biotransformação e da nicotinamida após a administração do nicorandil em camundongos e correlacionar esses parâmetros com a duração do efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Camundongos Swiss machos (25 a 30 g) provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG foram utilizados neste estudo. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*, exceto quando o protocolo exigia administração *per os* (*p.o.*). Nesse caso, os animais foram submetidos à restrição alimentar de, no mínimo, 6 h. A temperatura da sala de experimentação foi mantida em 27 ± 1 °C, correspondente à zona de termoneutralidade de roedores (GORDON, 1990). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h e ambientados na sala de experimento por pelo menos três dias antes da realização de todos os protocolos. Durante os experimentos, os animais foram manipulados cuidadosamente, de forma a resultar no menor estresse comportamental possível. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo 131/11). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para experimentação relacionada à dor em animais (ZIMMERMANN, 1986).

4.2 Drogas

- 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) – Vitamina do complexo B.
- N-(2-hidroxietil) nicotinamida (NHN) – sintetizado pelo Prof. Ângelo de Fátima – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG – Metabólito denitrado do nicorandil.
- Glibenclamida (Sigma, EUA) – Bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes.
- 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) (Sigma, EUA). – Inibidor da enzima guanilato ciclase.
- Cloridrato de naltrexona (Sigma, EUA) – Antagonista opioidérgico.

- Diclofenaco sódico (Sigma, EUA) – Anti-inflamatório não-esteróide.
- Dipirona sódica (Sigma, EUA) – Analgésico e antipirético.
- Fenobarbital (Aventis Pharma, Brasil) – Depressor do SNC, controle positivo no teste da haste girante.
- Formaldeído (Carlo Erba, Itália) – Estímulo inflamatório.
- Solução fisiológica (Sanobiol, Brasil) – Veículo.
- Carboximetilcelulose (CMC; Galena, Brasil) – Veículo para nicorandil e glibenclamida.
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Synth, Brasil) – Veículo para nicorandil e ODQ.
- Heparina (Eurofarma, Brasil) – Anticoagulante
- Halotano (Cristália, Brasil) – Anestésico inalatório

4.3 Preparo das soluções e suspensões

As soluções de nicotinamida, diclofenaco, naltrexona e dipirona foram preparadas em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. As suspensões de nicorandil, NHN e fenobarbital, para administração *p.o.*, foram preparadas em suspensão de carboximetilcelulose 0,5% p/v em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, e a suspensão de glibenclamida foi preparada em CMC 1% em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. A suspensão de ODQ foi preparada em solução de DMSO 4%. A suspensão para administração local (intraplantar, *i.pl.*) de nicorandil foi preparada em DMSO 2%. As soluções de formaldeído (0,92 ou 1,84%) foram preparadas em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. Todas as soluções ou suspensões foram preparadas imediatamente antes dos experimentos.

4.4 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos

No dia do experimento, os animais foram colocados sob funis de vidro (18 cm de diâmetro e 14 cm de altura) cerca de 30 min antes da injeção de formaldeído, para ambientação. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias de massa corporal dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Foram injetados 20 μ L da solução de formaldeído 0,92% por via subcutânea (s.c.) na superfície dorsal da pata posterior direita dos animais, exceto nos protocolos para investigação do possível efeito local induzido pelo nicorandil, nos quais foram injetados 10 μ L da solução de formaldeído 1,84%.

O tempo durante o qual o animal apresentou o comportamento de lambida após a injeção s.c. de formaldeído foi cronometrado nos períodos de 0-5 min e de 15-30 min, que correspondem à primeira e à segunda fases da resposta nociceptiva, respectivamente. Nesse modelo, o controle da temperatura ambiente (27-28°C) é importante, pois a segunda fase da resposta nociceptiva é bastante reduzida quando o experimento é realizado em temperatura inferior a 23 °C (TJØLSEN et al., 1992). Os resultados foram expressos como o tempo, em segundos, durante o qual os animais apresentaram o comportamento de lamber a superfície da pata injetada, durante a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva. A figura 6 mostra o aparato utilizado para esta avaliação.

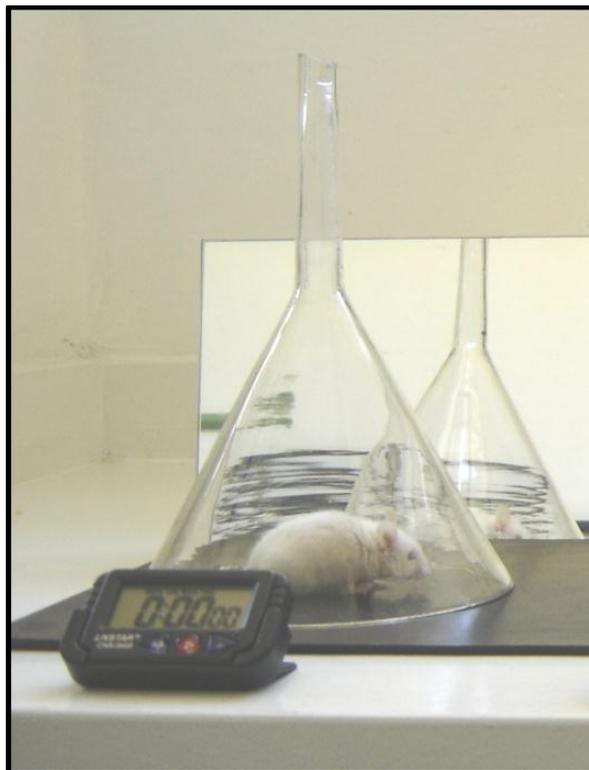


Figura 6 – Aparato utilizado para avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

- Intervalo de administração

Nicorandil, NHN ou nicotinamida foram administrados *p.o.* 60 min antes da injeção s.c. de formaldeído.

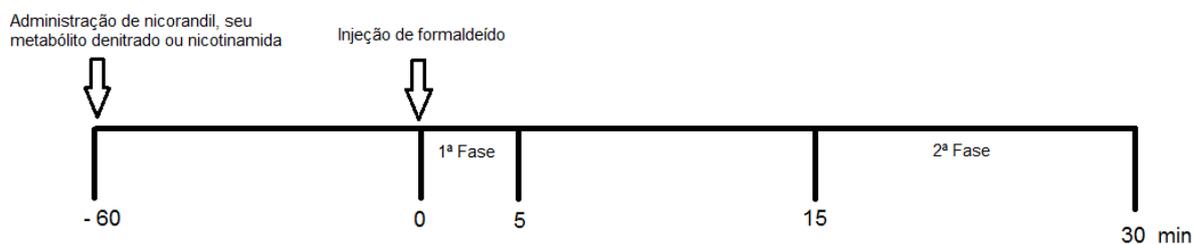


Figura 7 - Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelo nicorandil, pelo seu metabólito denitrado (NHN) ou pela nicotinamida sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

Os antagonistas ou inibidores utilizados foram administrados 30 (naltrexona ou ODQ) ou 60 (glibenclamida) min antes do nicorandil, dependendo da via de administração. Naltrexona e ODQ foram administrados por via i.p. e glibenclamida foi administrada *p.o.*. Em outro protocolo, glibenclamida foi administrada 1 h antes da administração *p.o.* do diclofenaco.

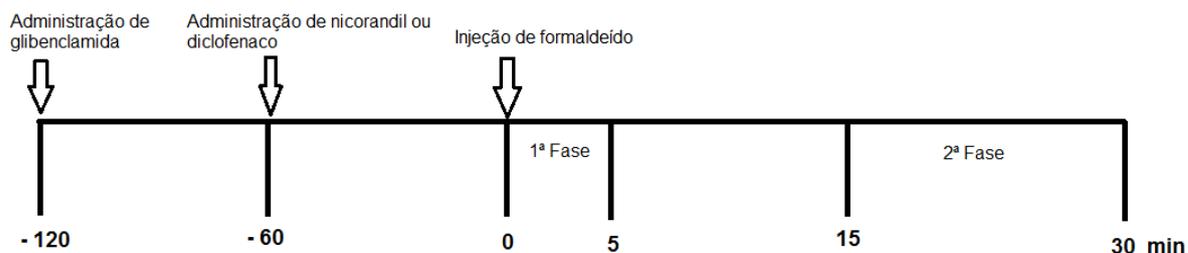


Figura 8 – Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelo nicorandil ou pelo diclofenaco, após tratamento prévio com glibenclamida, sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

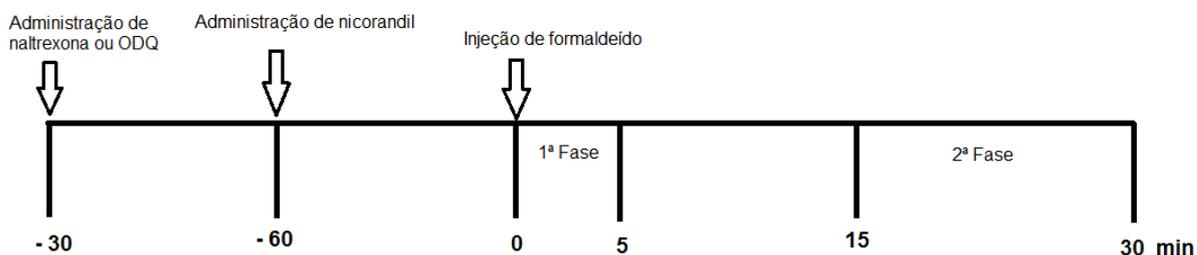


Figura 9 – Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelo nicorandil ou pelo diclofenaco, após tratamento prévio com naltrexona ou ODQ, sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

Na investigação do possível efeito local induzido pelo nicorandil ou pela dipirona, esses fármacos foram administrados por via i.pl. 20 min antes da injeção da solução de formaldeído. Os animais foram cuidadosamente monitorados no intervalo entre a administração do nicorandil ou do veículo e a injeção de formaldeído para verificar se a injeção da solução de nicorandil causava comportamento indicativo de desconforto aos animais.

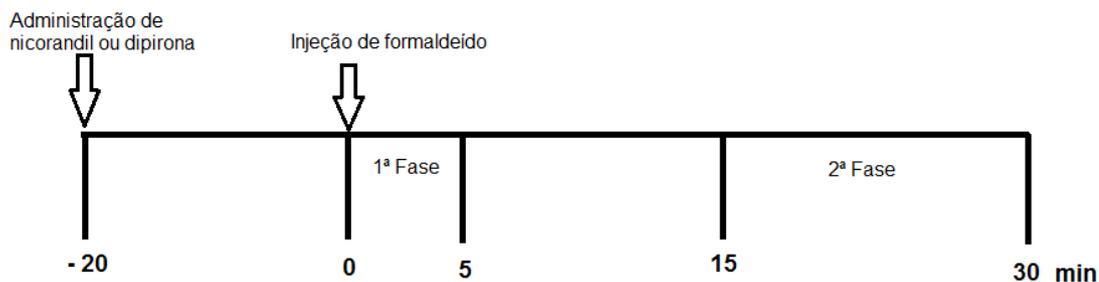


Figura 10 - Escala temporal de avaliação dos efeitos locais induzidos pelo nicorandil ou pela dipirona sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

4.5 Avaliação da atividade motora de camundongos no modelo da haste girante

A atividade motora foi avaliada na haste girante (Figura 11), de acordo com o procedimento proposto por Vaz e colaboradores (1996), que representa uma modificação daquele originalmente descrito por Dunham & Miya (1957). Durante três dias antes do experimento, em uma sessão diária, cada animal foi treinado no aparato durante 2 min. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias dos tempos de permanência basais fossem semelhantes. No dia do experimento, os animais foram tratados com os compostos e reavaliados no aparato a 14 rpm, determinando-se o tempo de permanência. O tempo de corte foi de 2 min.

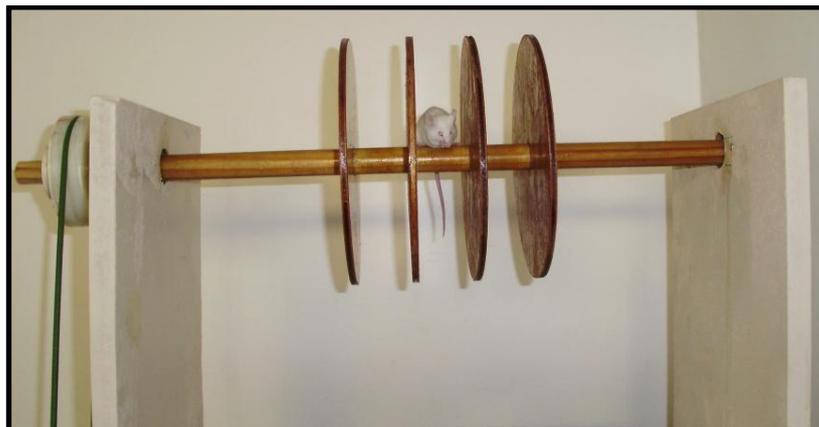


Figura 11 – Haste girante utilizada para avaliar a atividade motora de camundongos.

- **Intervalo de administração**

O nicorandil ou o controle positivo fenobarbital (40 mg/kg) foram administrados 60 min antes de colocar os camundongos sobre a haste girante.

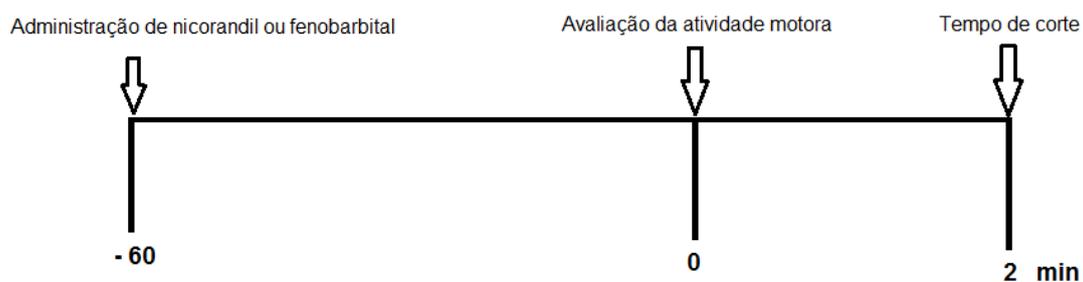


Figura 12 – Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelo nicorandil ou pelo fenobarbital sobre a coordenação motora.

4.6 Quantificação do nicorandil, do NHN e da nicotinamida no plasma de camundongos por LC-MS/MS

Os métodos utilizados para a quantificação do nicorandil, do NHN e da nicotinamida foram desenvolvidos e validados por César e colaboradores (2011), por meio de espectrometria de massas acoplado a dispositivo de íon-eletro-spray (LC-ESI-MS/MS). A fase móvel consistiu de metanol e uma solução aquosa de acetato de amônio 2 mM contendo ácido fórmico 0,03% (v/v) (33:67 v/v), sob o fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi 50 µL.

As faixas lineares de concentração para cada um dos compostos estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Faixas de concentração linear dos compostos avaliados

Composto	Faixa de concentração (ng/mL)
Nicorandil	25 a 75000
NHN	25 a 50000
Nicotinamida	25 a 10000

Para o estudo farmacocinético, o nicorandil foi administrado *p.o.* na dose de 50 mg/kg em 44 animais previamente submetidos à restrição alimentar de 6 h. Em diferentes momentos (5, 15, 30 e 45 min; 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 h) após a administração do nicorandil, um grupo de quatro animais foi eutanasiado por meio de decaptação, após anestesia com halotano. Doze animais (controle ou “branco”) receberam uma injeção de veículo e, em grupos de quatro, foram eutanasiados 0; 0,5 e 1 h após. Uma amostra de sangue de cada animal foi coletada em tubo heparinizado. As amostras de sangue foram imediatamente

centrifugadas a 14000 rpm por 10 min e, em seguida, amostras de plasma foram transferidas para tubos, que foram armazenados a -70 °C até a análise.

4.7 Análise estatística

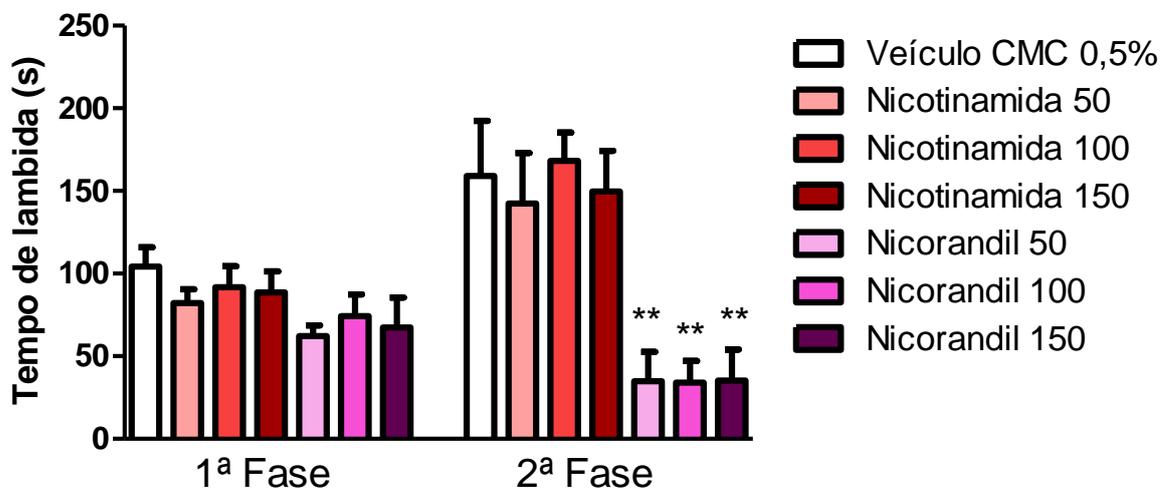
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, seguida pelo teste de Newman-Keuls – que realiza a comparação de todos os grupos entre si – ou teste t de Student – que compara isoladamente cada grupo com o controle. Adotou-se o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito induzido pelo nicorandil ou por doses equimolares do seu principal metabólito ou da nicotinamida sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído

O nicorandil, administrado *p.o.*, inibiu a segunda fase da resposta nociceptiva nas três doses avaliadas (50, 100 e 150 mg/kg). Entretanto, doses equimolares da nicotinamida ou do metabólito denitrado do nicorandil não inibiram essa resposta (Figuras 13A e 14). Os efeitos induzidos por doses menores do nicorandil (12,5 ou 25 mg/kg) também foram avaliados (Figura 13B). Apesar da dose de 25 mg/kg inibir parcialmente a resposta nociceptiva, essa redução não alcançou diferença estatisticamente significativa. As magnitudes dos efeitos antinociceptivos induzidos pelas três maiores doses do nicorandil não apresentaram diferença estatística significativa. Assim, para os protocolos subsequentes, a menor dose do nicorandil (50 mg/kg) que induziu efeito antinociceptivo foi selecionada.

A



(B)

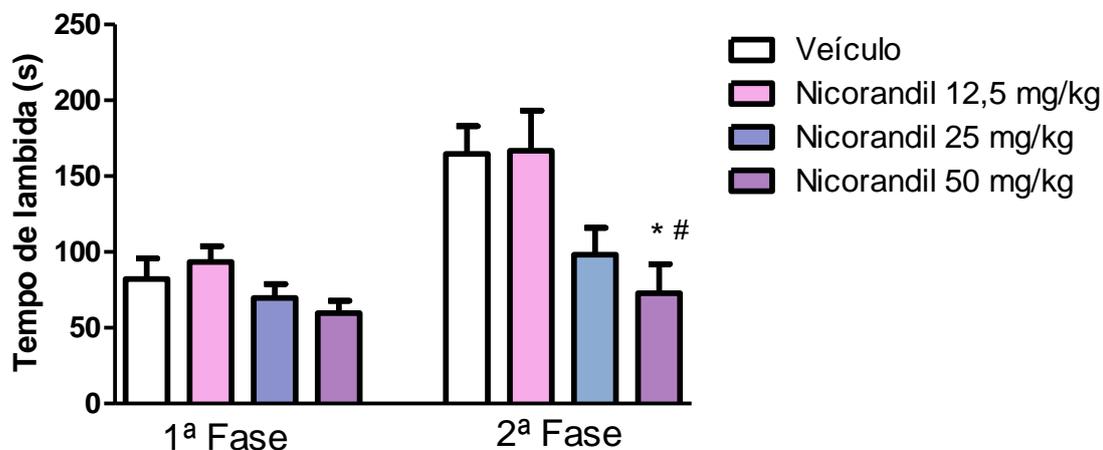


Figura 13 – (A) Efeitos induzidos pelo nicorandil ou por doses equimolares nicotinamida (50, 100 ou 150 mg/kg, *p.o.*, -1 h); *n*= 8; e (B) Efeitos induzidos pelo nicorandil 12,5, 25 ou 50 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) e # em relação ao grupo nicorandil 12,5 mg/kg ($p < 0,05$). *n*= 8

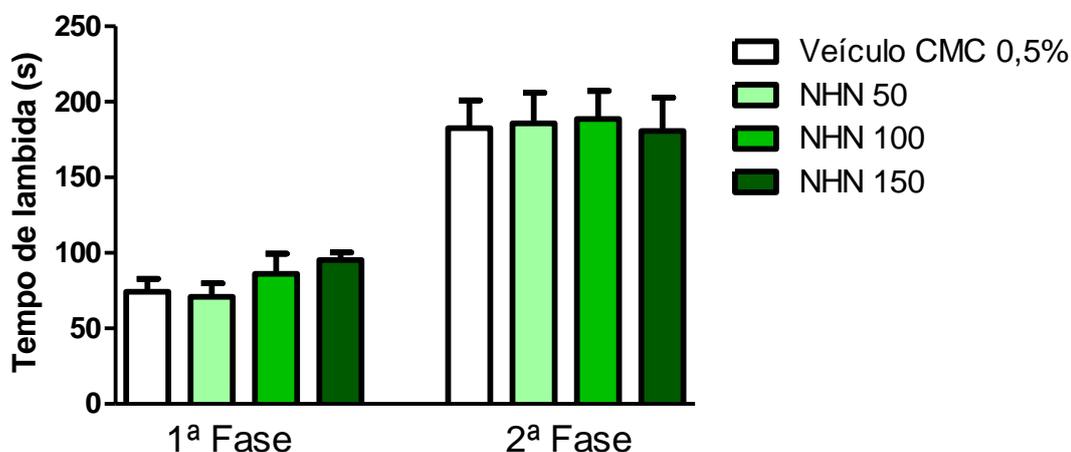


Figura 14 – Efeito induzido pelo NHN (doses correspondentes a 50, 100 ou 150 mg/kg do nicorandil) sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído. *n*= 6 – 8.

Com a finalidade de validar as conclusões obtidas a partir da análise dos efeitos induzidos pelo nicorandil sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído, foram avaliados os efeitos induzidos por esse fármaco sobre a coordenação

motora dos animais. O nicorandil não alterou 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 (Figura 15).

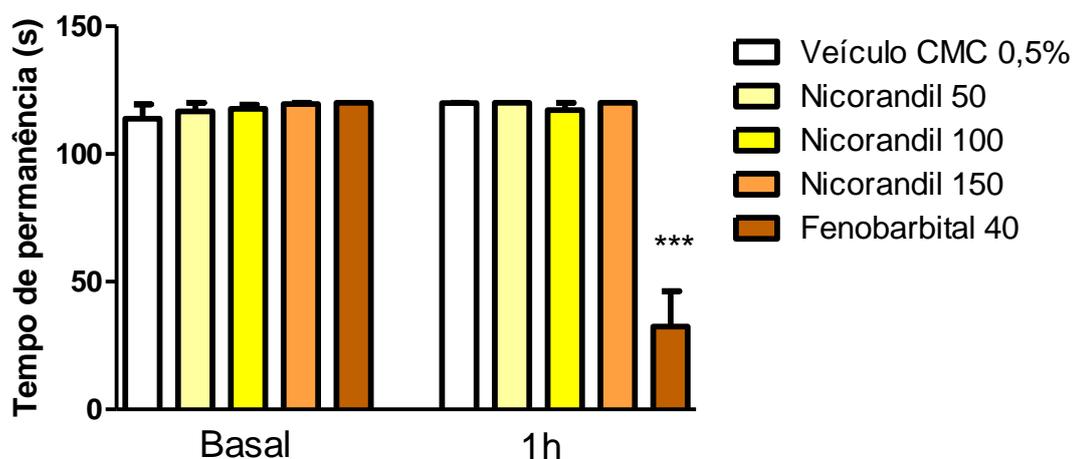


Figura 15 – Efeitos induzidos pelo nicorandil (50, 100 ou 150 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) ou pelo fenobarbital (40 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n = 6$.

Com o objetivo de avaliar a duração do efeito induzido pelo nicorandil no modelo experimental utilizado, foi realizado um protocolo no qual o fármaco foi administrado em diferentes momentos antes da administração de formaldeído. O nicorandil inibiu a primeira fase da resposta nociceptiva apenas quando administrado 0,5 h antes da administração de estímulo nociceptivo. Entretanto, a segunda fase da resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído foi inibida quando o nicorandil foi administrado 0,5, 1, ou 2 h antes. A administração do nicorandil 3 ou 4 h antes da administração do formaldeído não inibiu a resposta nociceptiva (Figura 16).

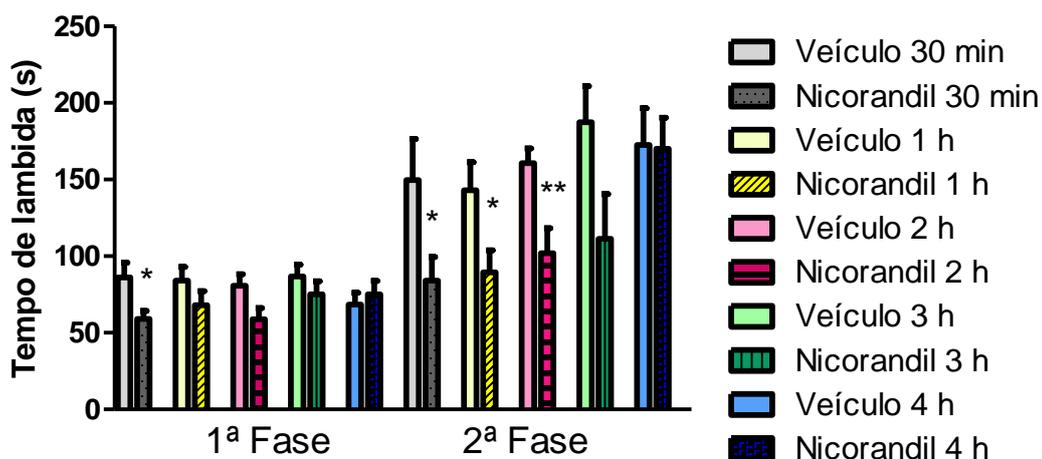


Figura 16 – Efeitos induzidos pelo nicorandil (50 mg/kg, *p.o.*), administrado em diferentes momentos (0,5; 1; 2; 3 ou 4 h antes), sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle no respectivo tempo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n = 8 - 10$.

5.2 Concentrações plasmáticas do nicorandil, do seu principal metabólito (NHN) e da nicotinamida após a administração do nicorandil

Após a administração *p.o.* do nicorandil (50 mg/kg), as concentrações plasmáticas máximas desse fármaco e do seu principal metabólito foram observadas 0,63 e 4 h, respectivamente (Figura 16). As concentrações de nicorandil nos períodos nos quais se identificou a indução de efeito antinociceptivo – isto é, entre 0,5 e 2 h – oscilaram entre 20.000 e 25.000 ng/mL. As concentrações do NHN, por sua vez, atingiram valores máximos próximos de 15.000 ng/mL depois da segunda hora após a administração do nicorandil. Por outro lado, as concentrações plasmáticas da nicotinamida oscilaram entre 1.400 e 3.300 ng/mL após a administração do nicorandil e não diferiram daquela encontrada no plasma de animais não tratados.

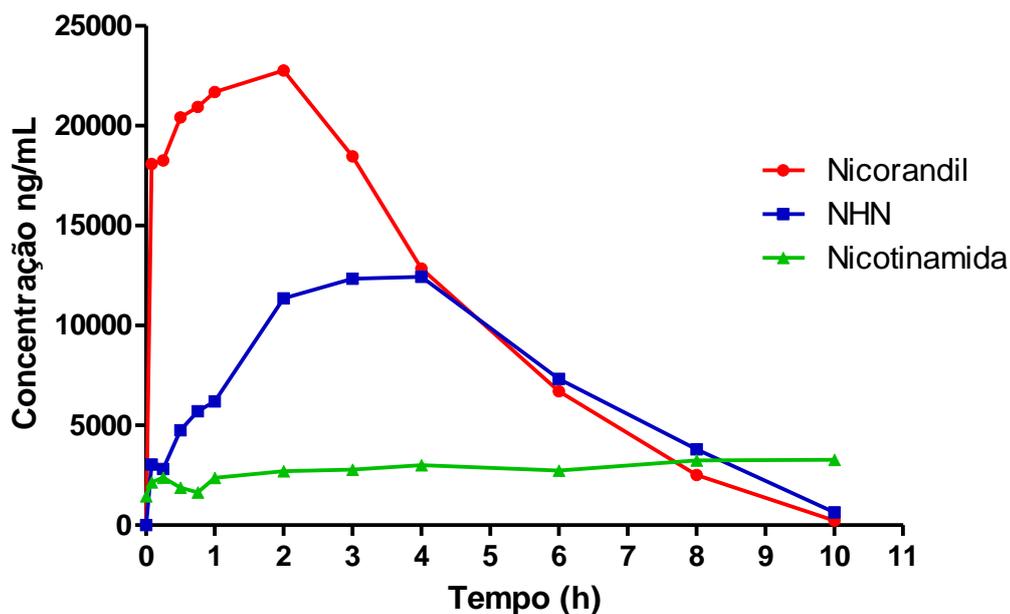


Figura 17 – Concentrações plasmáticas do nicorandil, do NHN e da nicotinamida observadas após a administração do nicorandil (50 mg/kg, p.o.). n=4 para cada ponto.

A partir da análise dos resultados apresentados na Figura 17, foram calculados alguns parâmetros farmacocinéticos para o nicorandil e para o NHN. Esses parâmetros (concentração plasmática máxima, T_{Max} e $T_{1/2}$) estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros farmacocinéticos calculados para o nicorandil e para o NHN.

	Concentração máxima (ng/mL)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)
Nicorandil	30.916	0,63	1,1
NHN	16.818	4,00	1,5

5.3 Efeitos induzidos pela glibenclamida, pela naltrexona e pelo ODQ sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil

A administração *p.o.* da glibenclamida (30 ou 60 mg/kg), 1 h antes da administração do nicorandil, não alterou o efeito antinociceptivo induzido por esse fármaco (Figura 18). Os resultados obtidos nesse protocolo foram validados por meio da demonstração de que as doses usadas da glibenclamida inibiram o efeito antinociceptivo induzido pelo diclofenaco (50 mg/kg, *p.o.*) no mesmo modelo experimental (Figura 19).

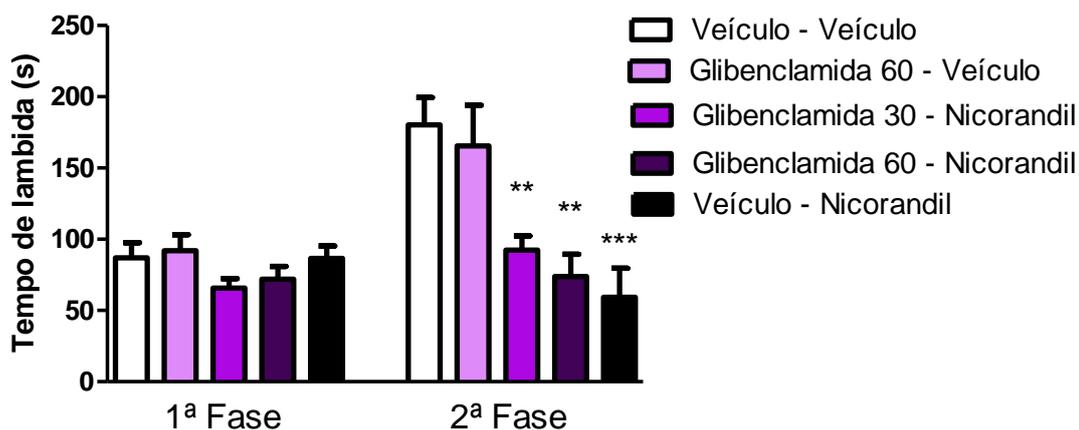


Figura 18 – Efeito induzido pela glibenclamida (30 ou 60 mg/kg, *p.o.*) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil (50 mg/kg, *p.o.*). A glibenclamida foi administrada 1 h antes do nicorandil e esse foi administrado 1 h antes do formaldeído. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 7 - 8$.

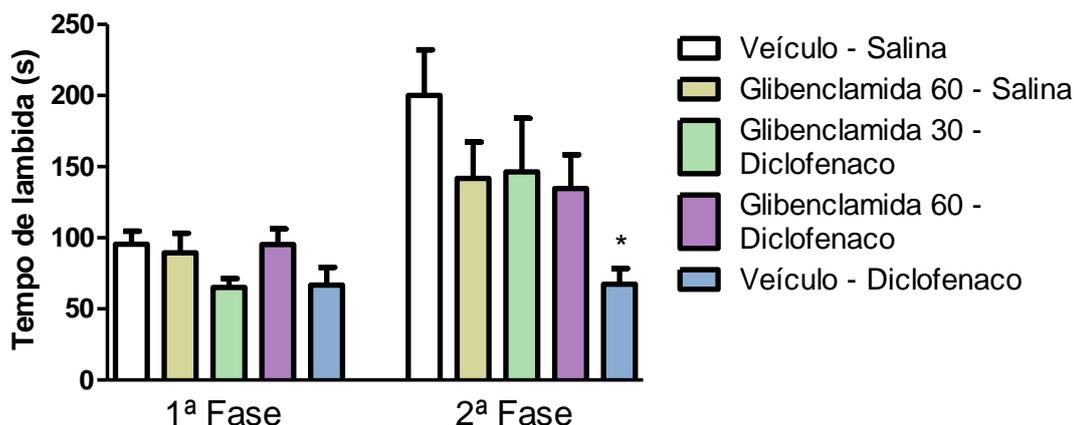


Figura 19 – Efeito induzido pela glibenclamida (30 ou 60 mg/kg, *p.o.*) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo diclofenaco (50 mg/kg, *p.o.*). A glibenclamida foi administrada 1 h antes do diclofenaco e esse foi administrado 1 h antes do formaldeído. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). $n = 6 - 8$.

A administração *i.p.* da naltrexona (2 ou 5 mg/kg), 0,5 h antes da administração do nicorandil, reverteu o efeito antinociceptivo induzido por esse fármaco (Figura 20).

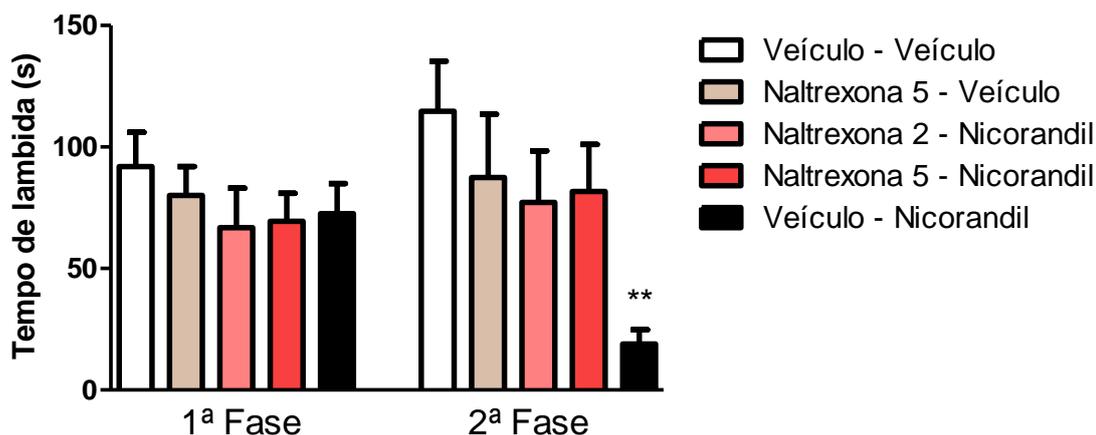


Figura 20 – Efeito induzido pela naltrexona (2 ou 5 mg/kg, *i.p.*) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil (50 mg/kg, *p.o.*). A naltrexona foi administrada 0,5 h antes do nicorandil e esse foi administrado 1 h antes do formaldeído. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). $n = 7 - 9$.

A administração i.p. do ODQ (0,5; 1 ou 2 mg/kg), 0,5 h antes da administração do nicorandil, atenuou o efeito antinociceptivo induzido por esse fármaco (Figura 21).

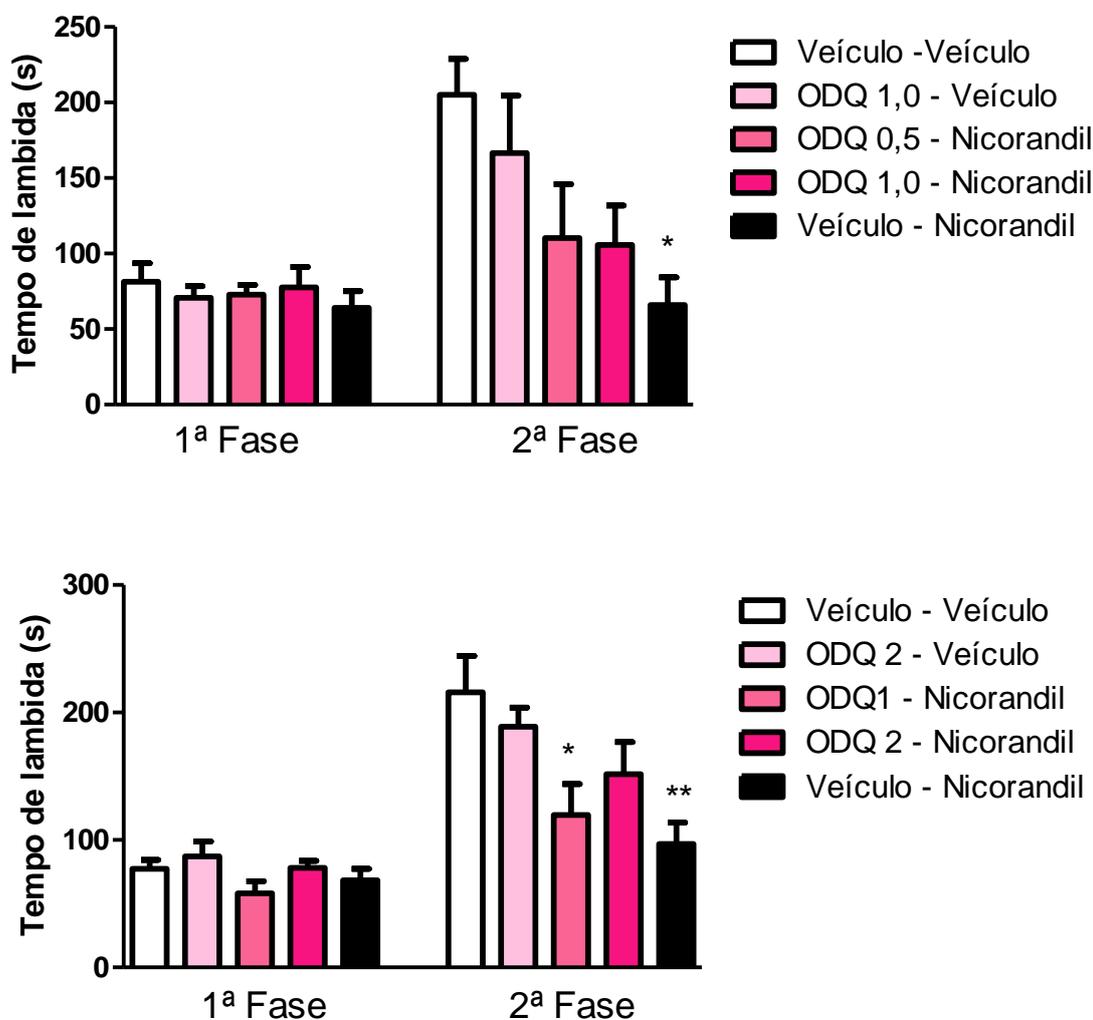


Figura 21 – Efeito induzido pelo ODQ (0,5; 1 ou 2 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil (50 mg/kg, p.o.). O ODQ foi administrado 0,5 h antes do nicorandil e esse foi administrado 1 h antes do formaldeído. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n = 7 - 8$.

5.4 Efeito induzido pela administração intraplantar do nicorandil sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído

Com o objetivo de avaliar se o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil pode ser resultado de uma ação local, ou seja, na pata onde foi injetado o formaldeído (10 μ L, 1,84%), esse fármaco foi administrado por via i.pl. nas doses de 125, 250 ou 500 μ g/pata, 20 min antes do estímulo nocivo. O nicorandil, administrado diretamente na pata, não inibiu a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído (Figura 23). Os animais foram cuidadosamente monitorados no intervalo entre a administração do nicorandil ou veículo e a injeção de formaldeído para verificar se a injeção de nicorandil diretamente na pata induzia manifestações de desconforto. Os comportamentos dos diferentes grupos experimentais nestes 15 min não diferiram entre si. Os resultados obtidos nesse protocolo foram validados por meio da demonstração de que a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído pode ser inibida pela ação local de drogas. Assim, a injeção i.pl. de dipirona (200 μ g/pata) na pata ipsilateral, mas não na pata contralateral, 20 min antes da injeção de formaldeído, inibiu a resposta nociceptiva (Figura 24).

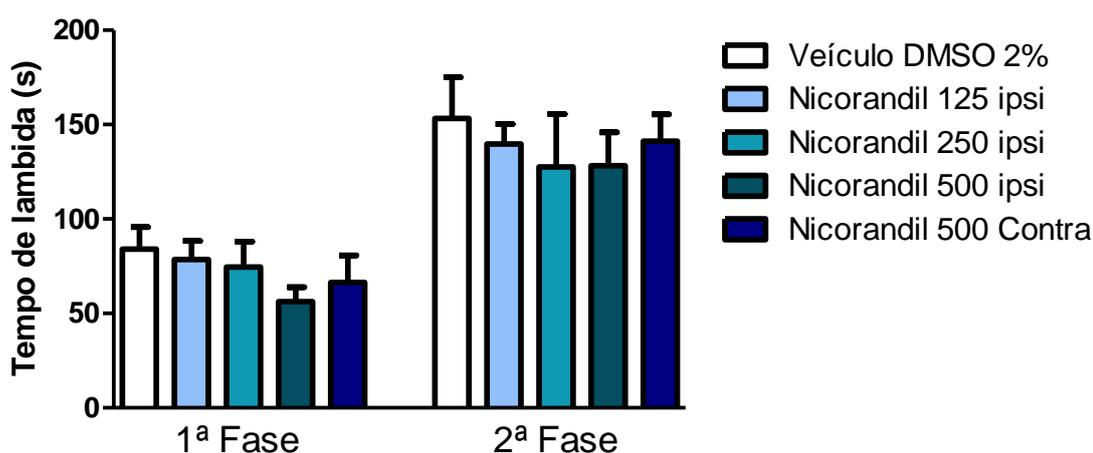


Figura 22 - Efeito induzido pela administração i.pl. ipsi ou contralateral do nicorandil (125, 250 ou 500 μ g/pata, -20 min) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído. n= 6 – 7.

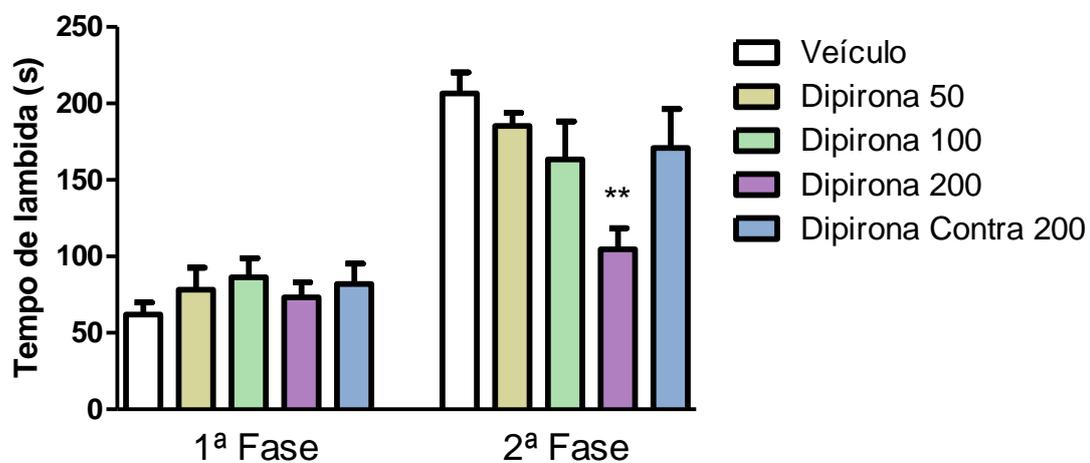


Figura 23 - Efeito induzido pela administração i.pl. ipsi ou contralateral da dipirona (50, 100 ou 150 $\mu\text{g/pata}$, -20 min) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). $n = 6 - 7$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo representam a primeira demonstração de que a administração sistêmica de nicorandil induz efeito antinociceptivo em um modelo experimental que apresenta características tanto de um modelo de dor nociceptiva quanto de um modelo de dor inflamatória. Em outro estudo, foi demonstrado que a administração intratecal (i.t.) de nicorandil exacerba o efeito antinociceptivo induzido por fentanila (agonista μ -opiode), betanecol (agonista muscarínico) e clonidina (agonista α_2 -adrenérgico) no modelo de retirada de cauda induzida por calor em ratos (YAMAZUNI et al., 2001). Por sua vez, Asano e colaboradores (2000) demonstraram que a administração epidural de nicorandil exacerba a analgesia induzida por morfina em ratos no teste de retirada de cauda. Entretanto, em ambos os estudos, não foi demonstrado efeito antinociceptivo induzido unicamente pelo nicorandil.

O modelo experimental de dor usado no presente estudo, a resposta nociceptiva induzida por formaldeído, é caracterizado pela expressão de um comportamento nociceptivo contínuo pelos animais e que resulta de lesão tecidual e consequente inflamação e também da ativação pelo formaldeído de receptores da família TRP (transient receptor potential), principalmente TRPA1 (McNAMARA et al., 2007) e TRPV1 (TIAN et al., 2009), em nociceptores. O modelo de resposta nociceptiva induzida por formaldeído é bastante útil para a investigação de potenciais drogas analgésicas, pois envolve componentes inflamatórios, neurogênicos e centrais da resposta nociceptiva (TJØLSEN et al., 1992).

A resposta nociceptiva induzida por formaldeído tem um perfil bifásico: a primeira fase se inicia imediatamente após a injeção de formaldeído e dura cerca de 5 min. Essa fase envolve a ativação direta de nociceptores, particularmente do tipo C (TJØLSEN et al., 1992). A primeira fase pode ser inibida por analgésicos opioides (SEVOSTIANOVA et al., 2003), que inibem diretamente a transmissão

ascendente da informação nociceptiva a partir do corno dorsal da medula espinhal, possivelmente por ativação de correntes de potássio e supressão de correntes de cálcio (GUTSTEIN & AKIL, 2006). Outras drogas, incluindo antidepressivos tricíclicos (SAWYNOK et al., 1999; ZARRINDAST et al., 2004) e anticonvulsivantes (PAUDEL et al., 2011; SHANNON et al., 2005), também inibem a primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

Por sua vez, a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído começa entre 15 a 20 min após a injeção e tem duração de 20 a 60 min, dependendo da espécie animal e da concentração da solução de formaldeído usadas. Essa fase compreende mecanismos centrais e periféricos, uma vez que ocorre a sensibilização de neurônios do corno dorsal da medula espinhal e também a produção de múltiplos mediadores inflamatórios no local da injeção, tais como histamina, serotonina e prostaglandinas, o que leva à sensibilização dos nociceptores. A segunda fase pode ser inibida por tanto por drogas de ação central como anti-inflamatórias, como os AINEs (BISPO JÚNIOR et al., 2011; HUNSKAAR & HOLE, 1987; LEÓN-REYES et al., 2009; MORGAN et al., 1992; ORTIZ, 2012; ROSLAND et al., 1988).

Os resultados do presente estudo demonstram que o nicorandil apresenta atividade antinociceptiva que se assemelha àquela das drogas ou dos fármacos com atividade anti-inflamatória, como os AINES indometacina (BISPO JÚNIOR et al., 2011; MORGAN et al., 1992) e diclofenaco (LEÓN-REYES et al., 2009; ORTIZ, 2012), uma vez que inibe predominantemente a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. Entretanto, quando o nicorandil foi administrado 30 min antes da injeção de formaldeído, houve também inibição parcial da primeira fase da resposta nociceptiva. Uma vez que o nicorandil não alterou o tempo de permanência dos animais na haste girante, é muito pouco provável que atenuação do comportamento nociceptivo induzida por esse fármaco seja resultado de comprometimento da atividade motora ou de relaxamento muscular.

Uma análise da estrutura química do nicorandil indica claramente que esse fármaco é constituído por uma molécula de nicotinamida acoplada a um doador de óxido nítrico, o que permite algumas considerações sobre possíveis mecanismos que contribuem para a sua atividade antinociceptiva. Entre as possibilidades, podem ser enumeradas: 1- atividade antinociceptiva indireta, resultante da ação da nicotinamida. Nicotinamida apresenta atividade antinociceptiva (GODIN et al., 2011) e pode ser formada a partir do nicorandil *in vivo* (FRYDMAN, 1989); 2- atividade antinociceptiva indireta, resultante da ação do NHN, que é o principal produto de biotransformação (BACHERT & FUNG, 1993; CÉSAR et al., 2011; FRYDMAN, 1989); 3- atividade antinociceptiva indireta, resultante da ação do NO. Drogas doadoras de NO apresentam atividade antinociceptiva (DUARTE et al., 1990; ROMERO-SANDOVAL et al., 2002; SOARES et al., 2000; SOUSA & PRADO, 2001) e nicorandil possui a capacidade de liberar NO (LEFER & LEFER, 1988; SAKAI et al., 2000); 4- atividade antinociceptiva direta, resultante da ação do nicorandil, sem que seja necessária sua biotransformação; 5- atividade antinociceptiva resultante de uma combinação de dois ou mais dos mecanismos citados.

Em relação à primeira possibilidade, ou seja, a atividade antinociceptiva do nicorandil resultar da formação de nicotinamida, os resultados do presente estudo indicam que é improvável. Essa conclusão resulta de duas observações. Primeiro, doses equimolares de nicotinamida não induziram efeito antinociceptivo no modelo experimental usado. Godin e colaboradores (2011), utilizando o mesmo modelo experimental, demonstraram o efeito antinociceptivo induzido por nicotinamida na dose de 1000 mg/Kg, sendo que doses de 125, 250 e 500 mg/Kg não induziram tal efeito. No presente estudo, a dose de 50 mg/Kg de nicorandil induziu efeito antinociceptivo, indicando que esse fármaco apresenta potência aproximadamente 20 vezes superior àquela da nicotinamida no modelo experimental usado. Outra observação que contribui para a conclusão de que a nicotinamida não deve mediar a atividade antinociceptiva do nicorandil é a ausência de um aumento da concentração plasmática da nicotinamida após a administração do nicorandil. As concentrações plasmáticas de nicotinamida foram

muito inferiores àsquelas do nicorandil, praticamente não alteraram durante o período avaliado e não diferiram das concentrações plasmáticas observadas antes da administração do nicorandil.

Em relação à segunda possibilidade, ou seja, a atividade antinociceptiva do nicorandil resultar da formação do NHN, o principal produto de biotransformação, os resultados do presente estudo também indicam que é improvável. Essa conclusão também resulta de duas observações. Primeiro, doses equimolares de NHN não induziram efeito antinociceptivo no modelo experimental usado. Segundo, o período no qual se observam as concentrações plasmáticas mais elevadas do NHN após a administração do nicorandil (3 a 5 h) não se correlaciona com a duração da atividade do nicorandil, que somente induziu efeito antinociceptivo quando administrado entre 0,5 e 2 h antes da injeção de formaldeído.

Outra possibilidade mecanística, como mencionado, seria a atividade antinociceptiva do nicorandil resultar da formação e ação do NO. Como o nicorandil possui a capacidade de liberar NO e drogas doadoras de NO apresentam atividade antinociceptiva, tal possibilidade não é implausível. Diversos autores demonstraram o efeito antinociceptivo induzido por drogas doadoras de NO, apesar de algumas controvérsias. Duarte e colaboradores (1990) demonstraram o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo nitroprussiato de sódio, um nitrato orgânico bastante útil em emergências hipertensivas, em ratos no teste de Randall-Selitto modificado, resultado confirmado também por Soares e colaboradores (2000) nos mesmos modelo e espécie. Por sua vez, Sousa & Prado (2001) demonstraram que doses reduzidas (até 2 µg, i.t.) de SIN-1, outro conhecido doador de NO muito usado em estudos em animais experimentais, reduzem a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo ciático e teste de retirada de cauda em ratos. Entretanto, esse mesmo efeito não foi observado quando foram usados em doses elevadas ou em outros modelos de nocicepção.

Além da demonstração do efeito antinociceptivo induzido por doadores de NO, tem sido demonstrado que AINES acoplados a um doador de NO podem apresentar atividade antinociceptiva mais marcante ou melhor perfil de segurança. Al-Swayeh e colaboradores (2000) compararam os perfis anti-inflamatório e antinociceptivo do ácido acetilsalicílico (AAS) e do seu derivado NO-AAS em vários modelos experimentais de dor e inflamação em ratos: edema de pata e hiperalgesia induzidas por carragenina, nocicepção induzida por formaldeído, constrições abdominais induzidas por ácido acético e teste de retirada de cauda induzida por calor. Em termos qualitativos, não houve diferenças entre os perfis das respostas induzidas pelas duas drogas, mas quantitativamente, isto é, em termos equimolares, NO-AAS mostrou-se mais potente, principalmente nos modelos de edema de pata e de constrições abdominais. Outro exemplo é o nitroparacetamol, que induz efeito antinociceptivo em doses menores que aquelas do paracetamol em um modelo experimental de dor induzida por estímulos mecânico ou elétrico em ratos (ROMERO-SANDOVAL et al., 2002). Esses autores também demonstraram que o nitroparacetamol, mas não o paracetamol, apresenta atividade anti-inflamatória genuína e induz efeito antinociceptivo no modelo experimental de dor neuropática induzida por constrição do nervo ciático em ratos (ROMERO-SANDOVAL et al., 2007; ROMERO-SANDOVAL et al., 2002).

Entretanto, os resultados do presente estudo não são suficientes para apontar a formação de NO a partir do nicorandil como essencial para a atividade antinociceptiva desse fármaco. Assumindo que o requisito simultâneo para a formação de NHN é a clivagem da molécula do nicorandil com formação de NO, observa-se que a liberação direta de NO pelo nicorandil deve ocorrer de forma mais marcante após algumas horas, uma vez que a concentração de NHN se apresenta mais elevada entre 3 e 5 h. Assim, a produção de NO, da mesma forma que a produção de NHN, não se correlacionaria com a duração da atividade do nicorandil, que só induziu efeito antinociceptivo quando administrado entre 0,5 e 2 h antes da injeção de formaldeído.

A quarta possibilidade seria a interação direta do nicorandil com um ou mais alvos moleculares para ativar mecanismos que resultem no efeito antinociceptivo. Essa possibilidade é bastante plausível, não só por que os principais produtos de biotransformação do nicorandil não têm papel importante (NHN e nicotinamida) ou tem papel menor (NO) nessa atividade, mas também por que há uma boa relação entre a duração do efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil e as concentrações plasmáticas desse fármaco. O perfil farmacocinético do nicorandil em camundongos se assemelha àquele observado em ratos. Os valores de T_{max} para camundongos (presente estudo) e ratos (César et al., 2011) foram 0,63 e 0,46 h, respectivamente. Por outro lado, os valores de $t_{1/2}$ para camundongos (presente estudo) e ratos (César et al., 2011) foram 1,1 e 1,9 h, respectivamente. As concentrações plasmáticas do nicorandil são máximas entre 1 e 2 h, decaindo após esse período. Coincidentemente, o nicorandil induziu efeito antinociceptivo quando administrado entre 0,5 e 2 h antes da injeção de formaldeído, sendo que esse efeito foi atenuado ou ausente quando o fármaco foi administrado 3 ou 4 h antes, respectivamente.

Considerando os resultados do presente estudo, outra possibilidade é que a atividade antinociceptiva do nicorandil seja resultado de uma ação direta e também da liberação de NO. Tal proposta também se aplica a fármacos do grupo dos AINES que são acoplados a doadores de NO.

Uma vez que o nicorandil induziu efeito antinociceptivo após administração sistêmica, foi investigado o efeito induzido por esse fármaco após a administração i.pl. em camundongos. A base racional para essa investigação está associada à tentativa de determinação do local de ação do nicorandil e também à observação de que drogas doadoras de NO podem induzir efeito antinociceptivo devido a uma ação local, ou seja, no sítio onde ocorre o processo inflamatório ou a aplicação de um estímulo nocivo. Estudo conduzido por Ferreira e colaboradores (1992) demonstrou que a aplicação tópica na pata de um gel contendo nitroglicerina atenua a hiperalgesia induzida pela injeção i.pl. de PGE_2 e

reduz o edema inflamatório neurogênico induzido por estimulação elétrica em ratos. A administração local (intra-articular) de nitroprussiato de sódio ou SIN-1 induz efeito antinociceptivo em modelo de artrite induzido por zimosano em ratos (ROCHA et al., 2002). A administração i.pl. de nitroprussiato de sódio também atenua a hiperalgisia induzida pela injeção i.pl. de PGE₂ em ratos (ALVES et al., 2004a).

Entretanto, no presente estudo, não foi observado efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil após a injeção i.pl. em camundongos. Embora diferenças quanto às espécies animais e modelos experimentais usados nos estudos mencionados possam contribuir para explicar os diferentes resultados encontrados, há diversas evidências de que o nicorandil, apesar de ser um fármaco que libera NO, apresenta muitas diferenças em relação a outros fármacos ou drogas que também liberam NO, particularmente os nitratos orgânicos.

Como discutido anteriormente, no caso do nicorandil, o NO não parece ser um mediador absolutamente necessário para que esse fármaco induza o seu efeito antinociceptivo. Em estudos no contexto cardiovascular, no qual o nicorandil é mais extensamente investigado, já foi demonstrado que esse fármaco também apresenta diferenças evidentes em relação aos nitratos orgânicos mais conhecidos (nitroglicerina, nitroprussiato de sódio, mono e dinitrato de isossorbida), possivelmente por sua capacidade de também proporcionar a abertura de canais para potássio, uma atividade que parece estar ligada à porção nicotinamida da molécula do fármaco (EDWARDS & WESTON, 1990; TAIRA, 1987).

Greenberg e colaboradores (1991) demonstraram que a EC₅₀ do nicorandil é cinco vezes maior que as do mono ou dinitrato de isossorbida e 900 vezes maior que a da nitroglicerina, em relação à ativação da guanilato ciclase. Entretanto, o relaxamento vascular induzido pelo nicorandil é semelhante àquele induzido

pelos nitratos orgânicos, indicando que, mesmo sendo menos eficiente como ativador da guanilato ciclase, a sua atividade vasodilatadora não é reduzida. Por sua vez, Borg e colaboradores (1991) demonstraram que, dependendo do leito vascular estudado, a atividade vasodilatadora do nicorandil está associada a mecanismos distintos: a ativação de canais para potássio com reversão parcial do efeito por glibenclamida, como em segmentos de coronárias, ou a ativação da guanilato ciclase em anéis de aorta de ratos. Ainda, em uma preparação contendo artéria suína, o efeito vasodilatador foi associado aos dois mecanismos de forma simultânea. Esses resultados claramente indicam a complexidade de vias mecánísticas associadas ao efeito vasodilatador induzido pelo nicorandil, um fármaco que, apesar de ser um doador de NO, não tem comportamento idêntico àquele dos nitratos orgânicos tradicionais.

No presente estudo, também foram investigados mecanismos bioquímicos que poderiam contribuir para a atividade antinociceptiva do nicorandil. O nicorandil, uma combinação entre a nicotinamida e um nitrato orgânico, possui um mecanismo dual que pode explicar seu efeito antianginoso e que justifica seu uso na farmacoterapia: a ativação da guanilato ciclase solúvel, aumentando a concentração intracelular de GMPc, e a abertura de canais para potássio ATP-dependentes, principalmente os mitocondriais (KUKOVETZ et al., 1992; SIMPSON & WELLINGTON, 2004). Apesar de bem compreendidos no contexto cardiovascular, esses mecanismos podem não ser os principais responsáveis pelo seu efeito antinociceptivo. Assim, a glibenclamida, um bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes (ALVES et al., 2004b) e o ODQ, um inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase (BOULTON et al., 1995; GARTHWAITE et al., 1995; ZHANG et al., 2011), foram usados com o objetivo de investigar se a ativação da guanilato ciclase e a abertura de canais para potássio ATP-dependentes poderiam mediar a atividade antinociceptiva do nicorandil. É amplamente conhecido que a atividade antinociceptiva de várias drogas ou fármacos, acoplados ou não a doadores de NO, é revertida por inibidores da guanilato ciclase ou de canais para potássio ATP-dependentes (ALVES et al.,

2004a; DUARTE e FERREIRA, 1992; DUARTE et al., 1992; FERREIRA et al., 1991; PRADO et al., 2002; SHIBUTA et al., 1996).

A administração prévia de ODQ atenuou em pequena extensão o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil. Entretanto, o ODQ, um inibidor irreversível da enzima guanilato ciclase solúvel, reverte a atividade antinociceptiva de várias drogas doadoras de NO em diferentes modelos experimentais (PRADO et al., 2002). Os resultados do presente estudo indicam que a ativação da guanilato ciclase não parece ser um evento importante para a indução do efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil. Esses resultados, assim como outros mencionados anteriormente, representam uma evidência adicional de que a atividade antinociceptiva do nicorandil não é essencialmente mediada pela formação de NO e reforça as diferenças entre esse fármaco e os nitratos orgânicos tradicionais.

A administração prévia de glibenclamida, por sua vez, não alterou a atividade antinociceptiva do nicorandil. Esse fármaco é amplamente usado no tratamento de pacientes diabéticos e também representa uma ferramenta farmacológica valiosa para a investigação experimental da participação de canais para potássio ATP-dependentes em diferentes fenômenos biológicos. A demonstração de que as doses de glibenclamida usadas no estudo atenuaram a atividade antinociceptiva do diclofenaco no mesmo modelo experimental indicam que a ausência de reversão da atividade antinociceptiva do nicorandil por esse bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes muito provavelmente não é resultado do uso de doses inadequadas. Esses resultados, mais uma vez, indicam diferenças importantes entre o nicorandil e os nitratos orgânicos, que podem ter seus efeitos atenuados por glibenclamida. Soares e colaboradores (2000) demonstraram que a atividade antinociceptiva do nitroprussiato de sódio no modelo de hiperalgisia mecânica induzida por PGE₂ em ratos é atenuada por glibenclamida. Esse mesmo inibidor atenua o efeito antinociceptivo induzido por várias drogas em diferentes modelos experimentais (ALVES et al., 2004a; LIMA

et al., 2010; YAMAZUMI et a., 2001), indicando que canais para potássio ATP-dependentes, apesar de não serem importantes para a atividade antinociceptiva do nicorandil, representam alvos moleculares essenciais para a ação de várias outras drogas.

Por outro lado, a administração prévia de naltrexona, um alcaloide sintético e antagonista não-seletivo de receptores opioides (GUTSTEIN & AKIL, 2006) atenuou de forma marcante o efeito antinociceptivo induzido pelo nicorandil. Esses resultados indicam que o nicorandil, apesar de apresentar um perfil que mais se assemelha àquele de drogas com atividade anti-inflamatória no modelo experimental usado no presente estudo, também pode ativar vias opioidérgicas. Como a naltrexona é um antagonista não-seletivo, não é possível inferir qual ou quais receptores opioides (μ , κ , ou δ) medeia/medeiam a atividade antinociceptiva do nicorandil. Entretanto, considerando outros resultados do presente estudo, é possível sugerir que receptores κ poderiam ser mais relevantes para essa atividade e sua lógica de raciocínio é discutida a seguir.

Vários estudos demonstraram que o efeito analgésico induzido por agonistas de receptores opioides é atenuado de forma marcante por antagonistas de canal para potássio ATP-dependentes, como a glibenclamida, em diversos modelos experimentais de dor e inflamação (KHANNA et al., 2011; NARITA et al., 1992; OCAÑA et al., 1990; OCAÑA et al., 1993; YANG et al., 1998). Considerando que a atividade antinociceptiva do nicorandil é mediada por mecanismos opioidérgicos, esperar-se-ia que fosse atenuada pelo tratamento prévio dos animais com glibenclamida, o que não ocorreu. Resultados obtidos por Amarante e Duarte (2004) podem ajudar na compreensão dos resultados do presente estudo. O efeito antinociceptivo induzido pela injeção i.pl. de bremazocina, um agonista seletivo de receptores κ -opioides, nos modelos de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina ou prostaglandina E_2 em ratos, não é revertido por bloqueadores de canais para potássio, incluindo glibenclamida e tetraetilamônio. Assim, é possível que o efeito antinociceptivo induzido pelo

nicorandil seja mediado pela ativação de mecanismos opioidérgicos via receptores κ -opioides, o que poderia explicar sua reversão pela naltrexona, mas não pela glibenclamida.

Em conclusão, os resultados demonstram que a administração sistêmica do nicorandil induz efeito antinociceptivo. Esse efeito provavelmente resulta de uma ação direta do nicorandil e não parece ser mediado pelo NHN, seu principal produto de biotransformação, ou pela nicotinamida. A ativação de mecanismos opioidérgicos medeia a atividade antinociceptiva do nicorandil. Os resultados indicam que esse fármaco, usado na farmacoterapia de pacientes com doenças cardiovasculares em alguns países e com bom perfil de segurança, pode representar uma alternativa importante no tratamento de pacientes que apresentam condições dolorosas diversas. Essas observações preliminares servem de estímulo à realização de ensaios pré-clínicos adicionais em diferentes modelos experimentais com objetivo de caracterizar de forma mais ampla a atividade antinociceptiva do nicorandil e, assim, justificar a realização de ensaios clínicos com o objetivo de investigar o potencial uso desse fármaco como analgésico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SWAYEH, O. A.; CLIFFORD, R. H.; DEL SOLDATO, P.; MOORE, P. K. A comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 129, n. 2, p. 343-350, jan. 2000.

ALTSCHUL, R.; HOFFER, A.; STEPHEN, J. D. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v. 54, n.2, p.558-559, feb. 1955.

ALVES, D. P.; SOARES, A. C.; FRANCISCHI, J. N.; CASTRO, M. S.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D. Additive antinociceptive effect of the combination of diazoxide, an activator of ATP-sensitive K⁺ channels, and sodium nitroprusside and dibutyryl-cGMP. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 489, n. 1-2, p. 59-65, apr. 2004a.

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

AMARANTE, L. H.; ALVEZ, D. P.; DUARTE, I. D. Study of the involvement of K⁺ channels in the peripheral antinociception of the kappa-opioid receptor agonist bremazocine. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 494, n. 2-3, p. 155-160, jun. 2004.

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

ASANO, T.; DOHI, S.; IIDA, H. Antinociceptive action of epidural K⁺(ATP) channel openers via interaction with morphine and an alpha(2)-adrenergic agonist in rats. *Anesth. Analg.*, Cleveland, v. 90, n. 5, p. 1146-1151, may 2000.

BACHERT, E. L.; FUNG, H. L.. High-performance liquid chromatographic method for stability and pharmacokinetic studies of nicorandil. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 619, n. 2, p. 336-341, sep. 1993.

BARBATO, J.C. Nicorandil – The drug that keeps on giving. *Hypertension*, Cleveland, v. 46, p. 647-648, sep. 2005.

BARTOSZYK, G.D.; WILD, A. B-vitamins potentiate the antinociceptive effect of diclofenac in carrageenin-induced hyperalgesia in the rat tail pressure test. *Neurosc. Lett.*, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 95-100, jun. 1989.

BARTOSZYK, G.D.; WILD, A. Antinociceptive effects of pyridoxine, thiamine, and cyanocobalamin in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 585, p. 473-476, 1990.

BERTOLLO, C. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; ROCHA, L. T. S.; COSTA, K. A.; NASCIMENTO JR., E. B.; COELHO, M. M. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 547, p.184–191, jul. 2006.

BHATTI, I.; COHEN, S.N.; BLEIKERT, T.; LUND, J.; TIERNEY, G. Nicorandil-induced foreskin ulceration. *Colorectal. Dis.*, London, v. 11, n. 4, p. 424 – 425, may 2009.

BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.; ALVES, M. A.; PEREZ-REBOLLEDO, A.; PARRILHA, G.L.; CASTELLANO, E. E.; PIRO, O. E.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; BERALDO, H. Analgesic and anti-inflammatory activities of salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H(2)LASSBio-466), salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H(2)LASSBio-1064) and their zinc(II) complexes. *Molecules*, Basel, v. 16, n. 8, p. 6902-6915, ago. 2011.

BOEHNKE, C.; REUTER, U.; FLACH, U.; SCHUH-HOFER, S.; EINHÄUPL, K.M.; ARNOLD, G. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care center. *Eur. J. Neurol.*, Oxford, v. 11, n. 7, p. 475-477, jul. 2004.

BONOMI, A. E.; SHIKIAR, R.; LEGRO, M. W. Quality-of-Life Assessment in Acute, Chronic, and Cancer Pain: A Pharmacist's Guide. *J. Am. Pharm. Assoc.*, Washington, v. 40, n. 3, p. 402-416, may/jun. 2000.

BORG, C.; MONDOT, S.; MESTRE, M.; CAVERO, I. Nicorandil: differential contribution of K⁺ channel opening and guanylate cyclase stimulation to its vasorelaxant effects on various endothelin-1-contracted arterial preparations. Comparison to aprikalim (RP 52891) and nitroglycerin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 259, n. 2, p. 526-534, nov. 1991.

BOULTON, C. L.; SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*, Oxford, v. 69, n. 3, p. 699-703, dec. 1995.

BROWER, V. New paths to pain relief. *Nat. Biotechnol.*, New York, v. 18, n. 4, p. 387-391, apr. 2000.

CÉSAR, I. C.; BASTOS, L. F.; GODIN, A. M.; COELHO, M. M.; ARAÚJO, D. P.; DE FÁTIMA, A.; GUIDINE, P. A.; PIANETTI, G. A. Simultaneous quantitation of nicorandil and its denitrated metabolite in plasma by LC-MS/MS for a pharmacokinetic study. *J. Mass. Spectrom.*, Chichester, v. 46, n. 11, p. 1125-1130, nov. 2011.

CHAN, H. N.; FAM, J.; NG, B. Use of antidepressants in the treatment of chronic pain. *Ann. Acad. Med. Singapore*, Singapore, v. 38, n. 11, p. 974-979, 2009.

CHIZH, B. A.; HEADLEY, P. M. NMDA Antagonists and neuropathic pain - multiple drug targets and multiple uses. *Curr. Pharm. Des.*, Seattle, v. 11, n. 23, p. 2977-2994, 2005.

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

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

CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L.; COSTANTINO, G.; ROMBOLÀ, L.; EMANUELA, M.; CAPUTI, A. P. Regulation of prostaglandin production by inhibition of poly (ADP-ribose) synthase in carrageenan-induced pleurisy. *Life Sci.*, Oxford, v. 65, n. 12, p. 1297-1304, oct. 1999.

DAVIES, N. M.; ROSETH, A. G.; APPELVARD, C. B.; McKNIGHT, W.; DEL SOLDATO, P.; CALIGNANO, A.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic and anti-inflammatory effects. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, Oxford, v. 11, n1, p. 69-79, feb. 1997.

DUARTE, I. D.; DOS SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 217, n. 2-3, p. 225-227, jul. 1992.

DUARTE, I. D.; FERREIRA S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 221, n. 1, p. 171 – 174, oct. 1991.

DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 186, n. 2-3, p. 289-293, sep. 1990.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.*, Baltimore, v. 46, n. 3, p. 208-209, mar. 1957.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, maio 2003.

EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends Pharmacol. Sci.*, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 417-422, oct. 1990.

EGRED, M. Nicorandil-associated ulcerations. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, London, v. 19, n. 5, p. 395 – 398, may 2007.

ELLIS, J.M.; FOLKERS, K.; LEVY, M.; SHIZUKUISHI, S.; LEWANDOWSKI, J.; NISHII, S.; SCHUBERT, H.A.; ULRICH, R. Response of vitamin-B6 deficiency and the carpal tunnel syndrome to pyridoxine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 79, n. 4, p. 7494-7498, apr. 1982.

EL-MOSELBY, M. A.; ABDEL-HAMID, N. M.; ABDEL-RAHEIM, S. R. Gastroprotective effect of nicorandil in indomethacin and alcohol-induced acute ulcers. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, New York, v. 152, n. 3, p. 449-459, mar 2009.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 201, n. 1, p. 121-122, aug. 1991.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; FACCIOLI, L. H. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 217, n. 2-3, p. 207-209, jul. 1992.

FOLKERS, K.; WOLANIUK, A.; VADHANAVIKIT, S. Enzymology of the response of the carpal tunnel syndrome to riboflavin and to combined riboflavin and pyridoxine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 81, n. 22, p. 7076-7078, nov. 1984.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M.M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 421, n. 3, p. 157-164, jun. 2001.

FRAMPTON, J.; BUCKLEY, M. M.; FITTON, A. Nicorandil: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in angina pectoris. *Drugs*, Auckland, v. 44, n. 4, p. 625-655, oct. 1992.

FRYDMAN, A. Pharmacokinetic profile of nicorandil in humans: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, New York, v. 20, suppl 3, s. 34 - 44, 1992.

FRYDMAN, A. M.; CHAPELLE, P.; DIEKMANN, H; BRUNO, R.; THEBAULT, J. J.; CAPLAIN, H.; UNGETHUEM, W.; GAILLARD, C.; LE LIBOUX, A. Pharmacokinetics of nicorandil. *Am. J. Cardiol.*, New York, v. 63, n. 21, p. 25J-33J, jun. 1989.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, London, v. 288, n. 5789, p. 373-376, nov. 1980.

GALE, E. A.; BINGLEY, P. J.; EMMETT, C. L.; COLLIER, T; EUROPEAN NICOTINAMIDE DIABETES INTERVENTION TRIAL (ENDIT) GROUP. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomized controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet*, London, v. 363, n. 9413, p. 925-931, mar. 2004.

GALVÃO, A. C. R. Tratamento da dor neuropática: uso de anticonvulsivantes. In: Dor neuropática: tratamento com anticonvulsivantes. São Paulo, Segmento Farma, p. 18-36. 2005

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; MAYER, B. A potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*, New York, v. 48, n. 2, p. 184-188, aug. 1995.

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. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Phoenix, v. 99, n. 4, p. 782-788, oct. 2011.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.*, Oxford, v. 47, n. 5, p. 963-991, may 1990.

GREENBERG, S. S.; CANTOR, E.; HO, E.; WALEGA, M. Comparison of nicorandil-induced relaxation, elevations of cyclic guanosine monophosphate and stimulation of guanylate cyclase with organic nitrate esters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 258, n. 3, p. 1061-1071, sep. 1991.

GUTSTEIN, H. B.; AKIL, H. Analgésicos opioides. In: BRUNTON L.L.; LAZO J.S.; PARKER K.L. (Eds.). *Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica*. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. Cap. 21, p. 487-526.

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

IONA STUDY GROUP, THE – Trial to show the impact of nicorandil in angina (IONA): Design, methodology and management. *Lancet*, London v. 359, n. 9314, p. 1269-1275, apr. 2002.

JOLIVALT, C. G.; MIZISIN, L. M.; CUNHA, J. M.; RAMOS, K. M.; CALCUTT, N. A. B vitamins alleviate indices of neuropathic pain in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 612, n. 1-3, p. 41-47, jun. 2010.

KAMIBAYASHI, T.; MAZE, M. Clinical uses of α -2-adrenergic agonists. *Anesthesiology*, Iowa City, v. 93, n. 5, p. 1345-1349, nov. 2000.

KEEBLE, J.E.; MOORE, P.K. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br. J. Pharmacol.*, London, v.137, n. 3, p.295-310, oct. 2002.

KERSTEIN, P. C.; DEL CAMINO, D.; MORAN, M. M.; STUCKY, C. L. Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Mol Pain*, London, v. 5, p. 19, 2009.

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

KNOOP, R. H. Clinical profiles of plain versus sustained-release niacin (Niaspan) and the physiologic rationale for nighttime dosing. *Am. J. Cardiol.*, New York, v. 82, n. 12A, p. 24U-28U, dec. 1998.

KUKOVETZ, W. R.; HOLZMANN, S.; PÖCH, G. Molecular mechanism of action of nicorandil. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, New York, v. 20, suppl. 3, feb.1992.

LEFER, D. J.; LEFER, A. M. Studies on the mechanism of the vasodilator action of nicorandil. *Life Sci.*, Oxford, v. 42, n. 19, p. 1907-1914, mar. 1988.

LEÓN-REYES, R. B., CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G., ORTIZ, M. I. Pharmacokinetic of diclofenac in the presenc and absence of glibenclamide in the rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, Edmonton, v. 12, n. 3, p. 280-287, sep. 2009.

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

LIPTON, R. B.; DIAMOND, S.; DIAMOND, M.; REED, M.; STEWART, W. F. Migraine diagnosis and treatment: results from the American Migraine Study II. *Headache*, Mount Royal, v. 41, n. 7, p. 638-645, jul.-aug. 2001.

MALATEAUX, J. M.; RICCI, F. R.; FRAGOSO, Y. D. Investigation of low back pain in a non-hospital population of the coastline of the State of São Paulo. *Rev. Dor*, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 19-22, jan.-mar. 2011.

MARCUS, R.; COULSTON, A.M. *Water-soluble vitamins. The vitamin B complex and ascorbic acid*. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.D. (Eds.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill, cap. 63, p. 1753-1771, 2001.

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*, Auckland, v. 60, n. 4, p. 955-974, oct. 2000.

MASIELLO, P.; NOVELLI, M.; FIERABRACCI, V.; BERGAMINI, E. Protection by 3-aminobenzamide and nicotinamide against streptozotocin-induced beta cell toxicity *in vivo* and *in vitro*. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, Westbury, v. 69, n. 1, p. 17-32, jul. 1990.

MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, aug. 2007.

MIESEL R.; KURPISZ M.; KRÖGER H. Modulation of inflammatory arthritis by inhibition of poly (ADP-ribose)polymerase. *Inflammation*, New York, v. 19, n. 3, p. 379-387, jun. 1995.

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

MONCADA S.; PALMER R. M.; HIGGS E. A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, Bethesda, v. 43, n. 2, p. 109 - 42, jun. 1991.

MORGAN, C. V. J.; BABBEDGE, R. C.; GAFFEN, Z.; WALLACE, P.; HART, S. L.; MOORE, P. K. Synergistic anti-nociceptive effect of L-N^G-nitro arginine methyl ester (L-NAME) and flurbiprofen in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 106, n. 2, p.493-497, jun. 1992.

NARITA, M., SUZUKI, T.; MISAWA, M.; NAGASE, H. Role of central ATP-sensitive potassium channels in the hyperthermic effect of morphine in mice. *Psychopharmacology (Berl)*., Berlin, v. 109, n. 1-2, p. 239-240, nov. 1992.

NOSAKI-TAGUSHI, N.; YAMAMOTO, T. Involvement of nitric oxide in peripheral antinociception mediated by kappa- and delta-opioid receptors. *Anesth. Analg.*, Cleveland, v. 87, n. 2, p. 388-393, aug. 1998.

OCAÑA, M., DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L.I.; BAEYENS, J. M. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 128, n. 2-3, p. 377-378, sep. 1990.

OCANÃ, M.; DEL POZO, E.; BAEYENS, J. M. ATP-dependent K⁺ channel blockers antagonize morphine- but not U-504,88H-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 230, n. 2, p. 203-207, jan. 1993.

ORTIZ, M. I. Metformin and phenformin block the peripheral antinociception induced by diclofenac and indomethacin on the formalin test. *Life Sci.*, Amsterdam, v. 90, n. 1-2, p. 8-12, jan. 2012.

PARK, H. J.; MOON, D. E. Pharmacologic management of chronic pain. *Korean J. Pain*, Seoul, v. 23, n. 2, p. 99-108, jun. 2010.

PAUDEL, K. R.; BHATTACHARYA, S.; RAUNIAR, G.; DAS, B. Comparison of antinociceptive effect of the antiepileptic drug gabapentin to that of various dosage combinations of gabapentin with lamotrigine and topiramate in mice and rats. *J. Neurosci. Rural Pract.*, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 130-136, jul. 2011.

PERO, R. W.; AXELSSON, B.; SIEMANN, D.; CHAPLIN, D.; DOUGHERTY, G. Newly discovered anti-inflammatory properties of the benzamides and nicotinamides. *Mol. Cell. Biochem.*, The Hague, v. 193, n. 1-2, p. 119-125, mar. 1999.

PRADO, W. A.; SCHIAVON, V. F.; CUNHA, F. Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 441, n. 1-2, p. 57-65, apr. 2002.

RAINVILLE, P. Brain Mechanisms of pain affect and pain modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, London, v. 12, n. 2, p. 195-204, apr. 2002.

RAWLINGSON, A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. *Burns*, London, v. 29, n. 7, p. 631 - 640, mar. 2003.

REYES-GARCÍA, G.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; TERÁN-ROSALES, F.; MATEOSGARCÍA, E.; CASTILLO-HENKEL, C. Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, New York, v. 42, n. 2, p. 73-77, oct. 1999.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E.; JANCAR, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 134, n. 4, p. 588-596, jun. 2002.

ROMERO, T. R.; GALDINO, G. S.; SILVA, G. C.; RESENDE, L. C.; PEREZ, A. C.; CÔRTEZ, S. F.; DUARTE, I. D. Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Anesth. Analg.*, Cleveland, v. 113, n. 5, p. 1254-1259, nov. 2011.

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. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 135, n. 6, p. 1556-1562, mar., 2002.

ROMERO-SANDOVAL, E. A.; CURROS-CRIADO, M. M.; GAITAN, G. Nitroparacetamol (NCX-701) and pain: First in a series of novel analgesics. *CNS Drug Rev.*, Brandford, v. 13, n 3, p. 279-295, 2007.

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

SAKAI, K.; AKIMA, M.; SAITO, M.; MATSUBARA, S. Nicorandil metabolism in rat myocardial mitochondria. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, Hagerstown, v. 35, n. 5, p. 723-728, may 2000.

SAWYNOK, J.; REID, A.R.; ESSER, M. J. Peripheral antinociceptive action of amitriptyline in the rat formalin test: involvement of adenosine. *Pain*, Amsterdam, v. 80, n. 1-2, p. 45-55, mar. 1999.

SEVOSTIANOVA, N.; ZVARTAU, E.; BESPALOV, A.; DANYSZ, W. Effects of morphine on formalin-induced nociception in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 462, n. 1-3, p. 109-113, feb. 2003.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.*, London, v. 5, suppl: p. 1062-1067, nov. 2002.

SCHOENEN, J.; JACQUY, J.; LENAERTS, M. Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis. A randomized controlled trial. *Neurology*, Hagerstown, v. 50, n. 2, p. 466-470, feb. 1998.

SHANNON, H. E.; EBERLE, E. L.; PETERS, S. C. Comparison of the effects of anticonvulsant drugs with diverse mechanisms of action in the formalin test in rats. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1012-1020, jun. 2005.

SMANIA, M. C.; GARCIA, P. C. R. Clonidina como droga sedativa e analgésica em pediatria. *Scientia Medica*, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 4, p. 270-273, out. 2005.

SHIBUTA, S.; MASHIMO, T.; ZHANG, P.; OHARA A.; YOSHIVA, I. A new nitric oxide donor, NOC-18, exhibits a nociceptive effect in the rat formalin model. *J. Neurol. Sci.*, Amsterdam, v. 141, n. 1-2, p. 1-5, sep. 1996.

SILVA, F. C.; MORENO, F. C. B.; BENDER, P. F. M.; CARVALHO, C. D. B. Prevenção da dor fantasma com o uso de cloridrato de amitriptilina. *Rev. Bras. Cancerol.*, Rio de Janeiro, v. 54, n. 4, p. 345-349, jul. 2008.

SIMON, B. A.; MOODY, E. J.; JOHNS, R. A. Gases terapêuticos – Oxigênio, dióxido de carbono, óxido nítrico e hélio. *Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica*. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. Cap. 15, p. 347-357.

SIMPSON D., WELLINGTON K. Nicorandil: a review of its use in the management of stable angina pectoris, including high-risk patients. *Drugs*, Auckland, v. 64, n. 17, p. 1941-1955, sep. 2004.

SOARES, A. C.; LEITE, R.; TATSUO, M. A.; DUARTE, I. D. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 400, n. 1, p. 67-71, jul. 2000.

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 897, n. 1-2, p. 9-19, apr. 2001.

STEWART, W. F.; RICCI, J. A.; CHEE, E.; MORGANTEIN, D.; LPTON, R. Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce. *JAMA*, Chicago, n. 290, n. 18, p. 2443-2454, nov. 2003.

TAIRA, N. Similarity and dissimilarity in the mode and mechanism of action between nicorandil and classical nitrates: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, New York, v. 10, suppl. 8, p. 1-9, 1987.

TIAN, L. J.; DU, Y. R.; XIAO, Y.; LV, Z. M.; YU, Y. Q.; CUI, X. Y.; CHEN, J. Mediating roles of the vanilloid receptor TRPV1 in activation of rat primary afferent nociceptive neurons by formaldehyde. *Acta Phys. Sin.*, Beijing, v. 61, n. 5, p. 404-416, oct. 2009.

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

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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Baltimore, v.278, p.304 –312, jul. 1996.

YASUDA, T.; HASHIMURA, K.; MATSU-URA, Y.; KATO, Y.; UEDA, T.; MORI, I.; KIJIMA, Y. Nicorandil, a hybrid between nitrate and ATP-sensitive potassium channel opener, preconditions human heart to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Jpn. Circ. J.*, Osaka, v. 65: p. 526-530, jun 2001.

YAMAZUMI, I.; OKUDA, T.; KODA, Y. Involvement of potassium channels in spinal antinociceptions induced by fentanyl, clonidine and bethanechol in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, Kyoto, v. 87, n. 4, p. 268-276, dec. 2001.

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

WALLACE, J. L.; REUTER, B.; CICALA, C.; McKNIGHT, W.; GRISHAM, M.; CIRINO, G. A diclofenac derivative without ulcerogenic properties. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 275, n. 3, p. 249-255, may, 1994.

WANG, Z. B.; GAN, Q.; RUPERT, R. L.; ZENG, Y. M.; SONG, X. J. Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. *Pain*, Amsterdam, v. 114, n. 1-2, p. 266-277, mar. 2005.

ZARRINDAST, M. R.; BAGHDADI, B.; SAHEBGHARANI, M. Potentiation of imipramine-induced antinociception by nicotine in the formalin test. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 71-76, jan. 2004.

ZHANG, Y.; QUOCK, L. P.; CHUNG, E.; OHGAMI, O.; QUOCK, R. M. Involvement of a NO-cyclic GMP-PKG signaling pathway in nitrous oxide-induced antinociception in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 654, n. 3, mar. 2011.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, Amsterdam, v.16, n. 2, p.109-110, jun. 1986.

ZIMMERMANN, M.; BARTOSZYK, G.D.; BONKE, D.; JURNA, I.; WILD, A. Antinociceptive properties of pyridoxine. Neurophysiological and behavioral findings. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 585, p. 219-230, 1990.