

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GLAUCIA TOBALDINI

CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE: UMA VIA DE MODULAÇÃO DA DOR
ASCENDENTE-DESCENDENTE QUE LIGA MECANISMOS MESOLÍMBICOS E
DESCENDENTES CLÁSSICOS



CURITIBA

2017

GLAUCIA TOBALDINI

CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE: UMA VIA DE MODULAÇÃO DA DOR
ASCENDENTE-DESCENDENTE QUE LIGA MECANISMOS MESOLÍMBICOS E
DESCENDENTES CLÁSSICOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fisiologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luana Fischer.

CURITIBA

2017



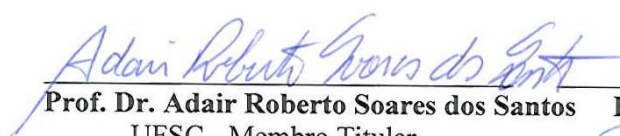
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia




Ata da Defesa de Tese de Doutorado de GLAUCIA TOBALDINI

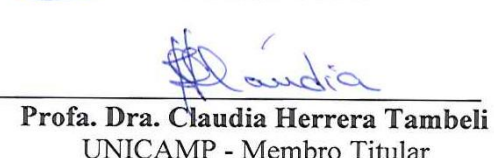
Aos vinte e sete dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezessete, foi realizada no anfiteatro do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de tese da doutoranda GLAUCIA TOBALDINI, intitulada “CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE: UMA VIA DE MODULAÇÃO DA DOR ASCENDENTE-DESCENDENTE QUE LIGA MECANISMOS MESOLÍMBICOS E DESCENDENTES CLÁSSICOS”. A abertura teve início às 08h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da candidata, Professora Doutora Luana Fischer. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua tese. Após a explanação oral, a Professora Doutora Luana Fischer passou à palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Adair Roberto Soares dos Santos do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSC. Na sequência, passou à palavra a segunda examinadora, Professora Doutora Joice Maria da Cunha do Departamento de Farmacologia da UFPR. Em seguida Passou a palavra ao terceiro examinador Professora Doutora Juliana Geremias Chichorro do Departamento de Farmacologia da UFPR e por último passou a palavra à quarta examinadora Professora Doutora Claudia Herrera Tambeli do departamento de Biologia Estrutural e Funcional da UNICAMP. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Luana Fischer fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “APROVAÇÃO”, habilitando-a ao título de Doutor em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professora Doutora Luana Fischer, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

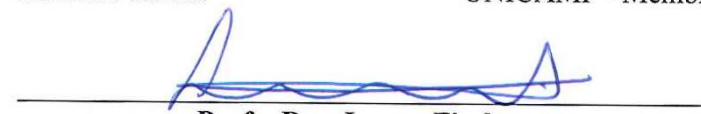
Curitiba, 27 de setembro de dois mil e dezessete.


Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
UFSC - Membro Titular


Profa. Dra. Joice Maria da Cunha
UFPR - Membro Titular


Profa. Dra. Juliana Geremias Chichorro
UFPR - Membro Titular


Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli
UNICAMP - Membro Titular


Profa. Dra. Luana Fischer
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Obrigada a todos que participaram direta ou indiretamente desta tese. Em quatro anos de doutorado e mais dois de mestrado muitas pessoas me ajudaram e fizeram parte dessa história.

Obrigada em especial aos meus pais, Enio e Adelma, que sempre me incentivaram a seguir na vida acadêmica e confiaram em minhas decisões. Me ajudaram quando foi preciso e sempre estiveram presente, mesmo tão longe. Obrigada ao meu irmão, Leandro, que participou deste sonho comigo desde o início. Lembra do resultado do mestrado? Até hoje sinto aquele abraço apertado, Nene! Obrigada a todos da família que se envolveram neste sonho comigo, em especial ao Tio Enzo e a Renana, vocês todos são demais.

Concluir o doutorado foi mais que realizar um sonho para mim. Foi parte do caminho que me levou a construir a família que eu tenho hoje. Graças à Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia e ao aceite da professora Luana Fischer é que cheguei até aqui. Quando olho para trás e vejo minha trajetória acadêmica me sinto muito realizada. Obrigada Luana pela orientação sempre presente, pela construção do pensamento crítico e pelo entusiasmo com a pesquisa científica. Obrigada à UFPR e ao Departamento de Fisiologia que me acolheram durante todos estes anos.

Foi por conta desta oportunidade que hoje Curitiba é minha casa, e aqui conheci o Isaac. Obrigada meu amor, você está comigo praticamente desde o início, dando força, sacudindo quando fosse preciso, comemorando os bons resultados. Este título também é seu e do nosso Joaquim, nossa maior produção em colaboração no doutorado (risos). Foram vocês que me fizeram ressignificar a vida e minhas conquistas.

Obrigada às minhas parceiras de apartamento (ou agregadas) e irmãs da vida, Andressa Perin Martins, Claudia Pudell Khunen, Dabna H. Tomim, Adriana A. Yamaguchi, Priscilla M. Costa dos Santos e Fabíola Nihi – a Fisiologia nos uniu para sempre.

Às minhas companheiras do Politécnico e para toda vida, que mais me ajudaram nos momentos delicados desse doutorado e foram muito importantes pra mim, Natalia F. Sardi e Katlyn B. Meyer, muito obrigada meus amores!

Às minhas amigas da vida, que são as melhores! Daniele Pegorini, Tatiana A. Yokoyama, Elizandra J. S. Hoffmann, Fernanda De Ré Lima e Keila O. Tavares Tampelini. Obrigada mesmo.

Aos meus colegas de laboratório Vinícius Guilhen, Rafael Reis, Mayla Lazzarim, Beatriz Hirano, Priscila Natume, Thaina Watanabe, Erick Andersen e Jhuliana Polato, muito obrigada pelos tantos momentos juntos.

Aos amigos e professores do laboratório de Neurofisiologia, em especial ao professor Marcelo de Meira Santos Lima, muito obrigada.

Obrigada à CAPES pelo auxílio financeiro e ao Governo Federal pela oportunidade do ensino gratuito e de qualidade em nosso país.

RESUMO

A via de modulação da dor mais importante e amplamente conhecida é o sistema descendente PAG-RVM (substância cinzenta periaquedutal – bulbo rostro ventromedial). Neste estudo, nós hipotetizamos que este sistema está funcionalmente ligado ao controle nociceptivo ascendente, uma forma de analgesia induzida por dor, dependente de mecanismos mesolímbicos. Para testar esta hipótese, usamos uma abordagem farmacológica, na qual a antinocicepção induzida por estimulação nociceptiva (injeção de capsaicina na pata dianteira) foi detectada em um modelo de dor inflamatória (injeção de carragenina na pata traseira). Esta antinocicepção foi bloqueada por intervenções reconhecidas por bloquearem a analgesia mediada pelo controle nociceptivo ascendente: o bloqueio dos receptores μ -opioide (CTOP, 0,5 μ g) ou dos receptores D₁ e D₂ de dopamina (SCH23390, 1,8 μ g e raclopride, 5 μ g) intra-NAc (núcleo accumbens) bem como o bloqueio dos receptores nicotínicos de acetilcolina (mecamilamina, 0,6 μ g) intra-RVM. Esta antinocicepção também foi bloqueada por intervenções reconhecidas por bloquearem os mecanismos descendentes inibitórios tanto intra-PAG quanto intra-RVM: bloqueio neuronal local agudo (lidocaína, 2%); bloqueio dos receptores μ -opioide (CTOP, 0,5 μ g) ou ativação dos receptores GABA_A (muscimol, 10 ng). De forma consistente, a antinocicepção foi bloqueada de forma semelhante por intervenções reconhecidas pelo bloqueio de mecanismos espinhais de inibição descendente: lesão do funículo dorsolateral e bloqueio espinhal dos receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} (WAY100135, 46 μ g) e 5HT₃ (tropisetron, 10 μ g); ou de receptores α 2-adrenérgicos (idazoxan, 50 μ g). A atividade neuronal, indiretamente estimada pela expressão de c-Fos, no NAc, PAG e RVM dá suporte as observações comportamentais. Portanto, este estudo fornece evidências funcionais para propor que a estimulação nociceptiva ativa uma via de modulação da dor ascendente-descendente que liga o sistema mesolímbico ao sistema descendente PAG-RVM.

Palavras-chave: modulação da dor; controle nociceptivo ascendente; sistema descendente substância cinzenta periaquedutal-bulbo rostro ventromedial; sistema mesolímbico; núcleo accumbens; PAG; RVM; medula espinhal; opioide; dopamina; estimulação nociceptiva; comportamento; rato.

ABSTRACT

The most powerful known pain modulation pathway is the PAG-RVM (periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla) descending system. In this study we hypothesized that it is functionally linked to the ascending nociceptive control, a form of pain-induced analgesia dependent on mesolimbic mechanisms. To test this hypothesis we used a pharmacological approach, in which the antinociception induced by noxious stimulation (forepaw injection of capsaicin) was detected in rat standard model of inflammatory pain (hindpaw injection of carrageenan). This antinociception was blocked by interventions recognized for blocking ascending nociceptive control-mediated analgesia: the blockade of μ -opioid receptors (CTOP, 0.5 μ g) or of dopamine D1 and D2 receptors (SCH23390, 1.8 μ g and raclopride, 5 μ g) within the NAc (nucleus accumbens) as well as the blockade of nicotinic acetylcholine receptors (mecamylamine, 0.6 μ g) within the RVM. This antinociception was also blocked by standard interventions recognized for blocking mechanisms of descending inhibition within either the PAG or the RVM: local acute neuronal blockade (lidocaine, 2%); blockade of μ -opioid receptors (CTOP, 0.5 μ g) or activation of GABA_A receptors (muscimol, 10 ng). Consistently, antinociception was similarly blocked by interventions recognized for blocking spinal mechanisms of descending inhibition: lesion of dorsolateral funiculus and the spinal blockade of serotonergic 5HT_{1A} receptors (WAY100135, 46 μ g); 5HT₃ receptors (tropisetron, 10 μ g) or α 2 adrenergic receptors (idazoxan, 50 μ g). Neuronal activity indirectly estimated by c-Fos expression within the NAc, PAG and RVM supports behavioral observations. Therefore, this study provides functional evidences to argue that noxious stimulation triggers an ascending-descending pain modulation pathway linking the mesolimbic system to the PAG-RVM descending system.

Keywords: pain modulation; ascending nociceptive control; periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla descending system; mesolimbic system; nucleus accumbens; PAG; RVM; spinal cord; opioid; dopamine; noxious stimulation; behavior; rat.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS CIRCUITOS DE MODULAÇÃO DA DOR..	14
FIGURA II - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISTRIBUIÇÃO SINÁPTICA DE RECEPTORES OPIOIDÉS NAS CÉLULAS “ON” E “OFF” DO RVM E SUAS PROJEÇÕES PARA A MEDULA ESPINHAL.....	15
FIGURE 1. EXPERIMENTAL DESIGN.	35
FIGURE 2. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION ON CARRAGEENAN-INDUCED HYPERALGESIA DEPENDS ON μ -OPIOID AND DOPAMINE RECEPTORS WITHIN NAC AND NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS WITHIN RVM.....	42
FIGURE 3. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION ON CARRAGEENAN-INDUCED HYPERALGESIA DEPENDS ON ACTIVATION OF μ -OPIOID RECEPTORS AND INHIBITION OF GABA _A RECEPTORS LOCATED ON PAG AND RVM.	45
FIGURE 4. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION ON CARRAGEENAN-INDUCED HYPERALGESIA DEPENDS ON THE INTEGRITY OF THE DORSOLATERAL FUNICULUS.....	46
FIGURE 5. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION ON CARRAGEENAN-INDUCED HYPERALGESIA DEPENDS ON SPINAL SEROTONERGIC AND ADRENERGIC BUT NOT DOPAMINE RECEPTORS.	49
FIGURE 6. C-FOS EXPRESSION IN THE NAC, PAG AND RVM.	51
SUPPLEMENTARY FIGURE S1. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION IS SIMILAR TO SYSTEMIC MORPHINE-INDUCED ANTINOCICEPTION.	52
SUPPLEMENTARY FIGURE S2. CONTROL GROUPS – BY THEMSELVES THE EXPERIMENTAL MANIPULATIONS DID NOT AFFECT CARRAGEENAN-INDUCED HYPERALGESIA.....	53
SUPPLEMENTARY FIGURE S3. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION IS SIMILAR TO INTRA-PAG DAMGO-INDUCED ANTINOCICEPTION.....	54
SUPPLEMENTARY FIGURE S4. MICROINJECTION SITES.	55
SUPPLEMENTARY TABLE 1. EFFECT (MEAN \pm S.E.M.) OF EXPERIMENTAL MANIPULATIONS ON LOCOMOTOR ACTIVITY IN THE OPEN FIELD TEST.	56

APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada em modelo misto, no qual os resultados estão apresentados sob a forma de artigo científico. Após a Introdução, Objetivos e Métodos há uma seção contendo o Artigo em língua inglesa. Em sequência há as seções de Discussão e de Conclusão, seguidas de todas as referências utilizadas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MECANISMOS ENDÓGENOS DE MODULAÇÃO DA DOR	13
3	RELAÇÃO ENTRE O CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE E O SISTEMA DESCENDENTE PAG-RVM	18
4	OBJETIVOS	19
4.1	OBJETIVO GERAL	19
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5	MÉTODOS	20
	ANIMAIS UTILIZADOS	20
	DROGAS UTILIZADAS	20
	PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS	21
	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	21
	LESÃO DO FUNÍCULO DORSOLATERAL.....	21
	MODELO COMPORTAMENTAL - PARA ESTUDAR A ANALGESIA MEDIADA PELO CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE	22
	INJEÇÕES DE DROGAS.....	22
	<i>Injeções na pata</i>	22
	<i>Microinjeções intracérebro</i>	23
	<i>Injeção intratecal</i>	23
	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	24
	<i>Teste mecânico de retirada de pata</i>	24
	<i>Teste do campo aberto</i>	24
	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA C-FOS	24
	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
6	ARTIGO CIENTÍFICO	27
7	DISCUSSÃO	62
8	CONCLUSÃO	67
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência das espécies envolve três desafios críticos: obter recursos (alimento e água) para si, obter sucesso na reprodução e evitar danos ao próprio corpo (Burrell, 2017). De fato, a capacidade de detectar estímulos que causem lesão real ou potencial é parte da definição de dor da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), que leva também em consideração o componente emocional associado a este estímulo (Merskey & Bogduk, 1994).

Podemos diferenciar **nocicepção** de **dor**, sendo que **nocicepção** refere-se aos mecanismos neurofisiológicos gerados pelo estímulo nocivo, isto é, o produto da estimulação das fibras nociceptivas aferentes primárias através de estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos (Basbaum et al., 2009). Enquanto **dor** envolve a percepção destes componentes fisiológicos (sensoriais) e da integração com componentes emocionais (Basbaum et al., 2009). A estimulação das fibras nociceptivas aferentes primárias leva a liberação de glutamato e peptídeos neuromodulatórios no corno dorsal da medula espinhal, acarretando na transmissão nociceptiva para os neurônios de segunda ordem, localizados nas lâminas I e II do corno dorsal. Os axônios dos neurônios de segunda ordem cruzam anterolateralmente e formam um trato ascendente (trato espinotalâmico, representado pelas linhas vermelhas na Figura I), que termina no tronco cerebral e várias áreas distintas do tálamo, que contêm neurônios de ordem superiores os quais projetam para várias regiões corticais e medeiam os diferentes aspectos da experiência dolorosa (Fields, 2004).

A **dor aguda**, possui natureza aversiva inerente, tem a capacidade de prender a atenção e dominar o comportamento do indivíduo, apresentando então, um caráter essencial à sobrevivência. Por conta disso, a habilidade em suprimir a percepção da dor também pode ser fundamental para a sobrevivência durante situações de ameaça. Cabe aos mecanismos neurais modular tais respostas, o que, ao longo da evolução das espécies, vem sendo feito com grande sucesso (Burrell, 2017). Com efeito, mecanismos endógenos de modulação da dor favorecem o indivíduo a se envolver em respostas ambientais de sobrevivência ou em comportamentos curativos, de acordo com que for mais vantajoso. Isto é, se escapar de uma situação de perigo for mais interessante, a dor é suprimida, mas não será se

a extensão da lesão exigir comportamento recuperativos, por exemplo (Porreca & Navratilova, 2017).

A compreensão dos **mecanismos** pelos quais o cérebro controla a percepção da dor aguda pode permitir sua manipulação para controlar a **dor persistente e crônica**. De fato, alterações no funcionamento de tais mecanismos é uma das causas de dor crônica - o tipo patológico de dor que causa sofrimento e é desprovido de propósito biológico. Várias drogas para o controle da dor agem em **mecanismos endógenos** de modulação da dor (Ossipov et al., 2010), no entanto, ainda estamos longe de tratar eficientemente a dor. Além do mais, o manejo inadequado da dor pelos sistemas de saúde envolve um enorme custo aos governos e aos próprios pacientes, e prejuízos à qualidade de vida destes indivíduos (Gaskin & Richard, 2012; Katz, 2002; McCarberg et al., 2008).

2 MECANISMOS ENDÓGENOS DE MODULAÇÃO DA DOR

O estudo de mecanismos endógenos de modulação da dor é muito amplo, desde que Melzack e Wall publicaram sua notável teoria sobre o portão da dor (Melzack & Wall, 1965), a ciência observou enormes avanços sobre o conhecimento dos mecanismos endógenos de modulação da dor. Nas décadas de 1970 e 1980, uma série de estudos culminou na descrição do que hoje é o mais conhecido sistema endógeno de modulação da dor: o sistema descendente PAG-RVM-medula espinhal (PAG, substância cinzenta periaquedutal; RVM, bulbo rostro ventromedial). Nele, múltiplas aferências provenientes da periferia e de diversas regiões do encéfalo, especialmente hipotálamo e sistema límbico convergem para PAG e então para o RVM, que controla a transmissão nociceptiva no corno dorsal através de vias descendentes que trafegam pelo funículo dorsolateral (DLF, do inglês, *dorsolateral funiculus*) da medula espinhal (Fields, 2004; Millan, 2002) (Figura I e II). A modulação da informação nociceptiva no corno dorsal depende especialmente de vias serotoninérgicas (provenientes do próprio RVM), noradrenérgicas (provenientes de projeções do locus coeruleus) e dopaminérgicas (provenientes da região hipotalâmica A11). Lesões das estruturas supracitadas ou bloqueio destes neurotransmissores ao nível espinhal afetam a analgesia da ativação desta via de modulação (Millan, 2002).

O RVM possui a capacidade de modular de forma inibitória ou facilitatória a informação nociceptiva no corno dorsal, isto é, pode ter papel anti-nociceptivo ou pró-nociceptivo de acordo com o balanço final das eferências. De fato, a excitação ou a administração de opioides nestes núcleos promove antinocicepção, enquanto a administração de agonista GABA_A (ácido γ -aminobutírico) tem papel pró-nociceptivo. Embora paradoxal, isto ocorre devido um complexo mecanismo celular de interneurônios na PAG e no RVM, no qual interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos localizados na PAG, inibem neurônios de projeção no RVM (células “Off” – inibitórias ou antinociceptivas), enquanto outro grupo de células no RVM (células “On” – facilitatórias ou pró-nociceptivas) mantém sua atividade (Fields, 2004). Acredita-se que os opioides ajam em receptores localizados nos interneurônios GABA e nas células “On”, assim ao inibir tais interneurônios ocorre desinibição das

células “Off” e ao mesmo tempo inibição das células “On”, o que resulta em analgesia (Fields, 2004). Este circuito está ilustrado na Figura II.

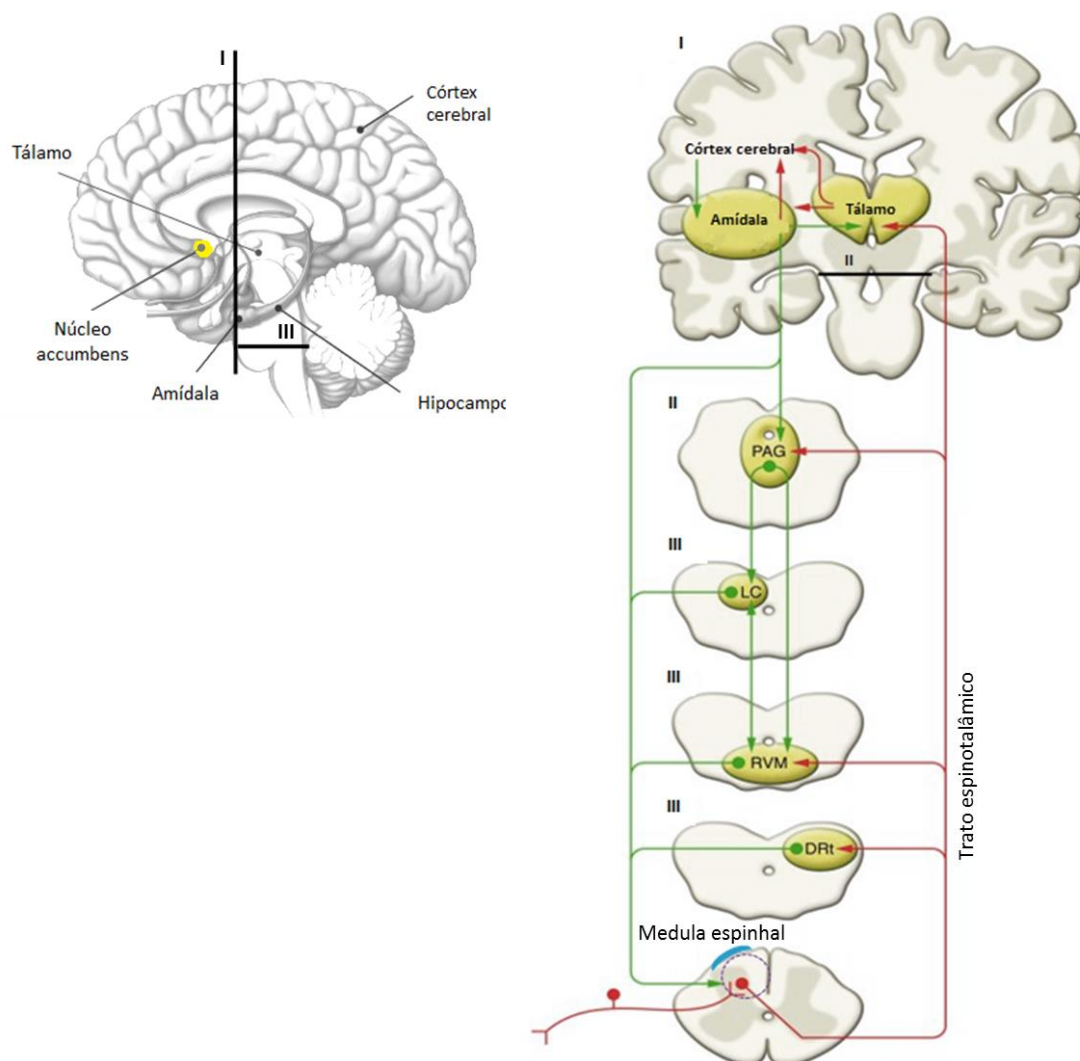


Figura I - Representação esquemática dos circuitos de modulação da dor. As entradas nociceptivas (em vermelho) entram no corno dorsal da medula espinhal (círculo pontilhado em roxo) e ascendem anterolateral através do trato espinotalâmico. Tais projeções chegam ao tálamo, enquanto as colaterais visam o DRt (subnúcleo reticular dorsal), o RVM (bulbo rostro ventromedial) e a PAG (substância cinzenta periaquedutal) - projeções descendentes a partir do DRt são essenciais à analgesia do DNIC. O tálamo por sua vez projeta para regiões corticais e para a amígdala. A modulação descendente (em verde) se dá através de projeções à PAG que projeta ao RVM de onde partem as projeções para a medula espinhal (através do funículo dorsolateral, representado em azul). Além disso, o locus coeruleus (LC) recebe projeções da PAG, se comunica com o RVM e envia projeções noradrenérgicas inibitórias ao corno dorsal. Figura adaptada de Ossipov et al. (2010).

Mais recente, a partir da década de 90, é o estudo de um sistema ascendente de modulação da dor. Observações iniciais demonstraram que o efeito antinociceptivo de agonistas opioides administrados na região lombar da medula espinhal, pode ser antagonizado, pelo menos em parte, por infusão intracerebroventricular de antagonista opioide (Holmes & Fujimoto, 1992; Lux et al.,

1988; Miaskowski & Levine, 1992; Welch et al., 1992). Estes estudos sugerem que a inibição de uma atividade tônica espinal promove a liberação supraespinal de opioides endógenos, o que contribuiria para o efeito antinociceptivo observado (Miaskowski & Levine, 1992). Desde então, vários estudos culminaram na descrição do que chamamos de *Controle Nociceptivo Ascendente* (Gear et al., 1999).

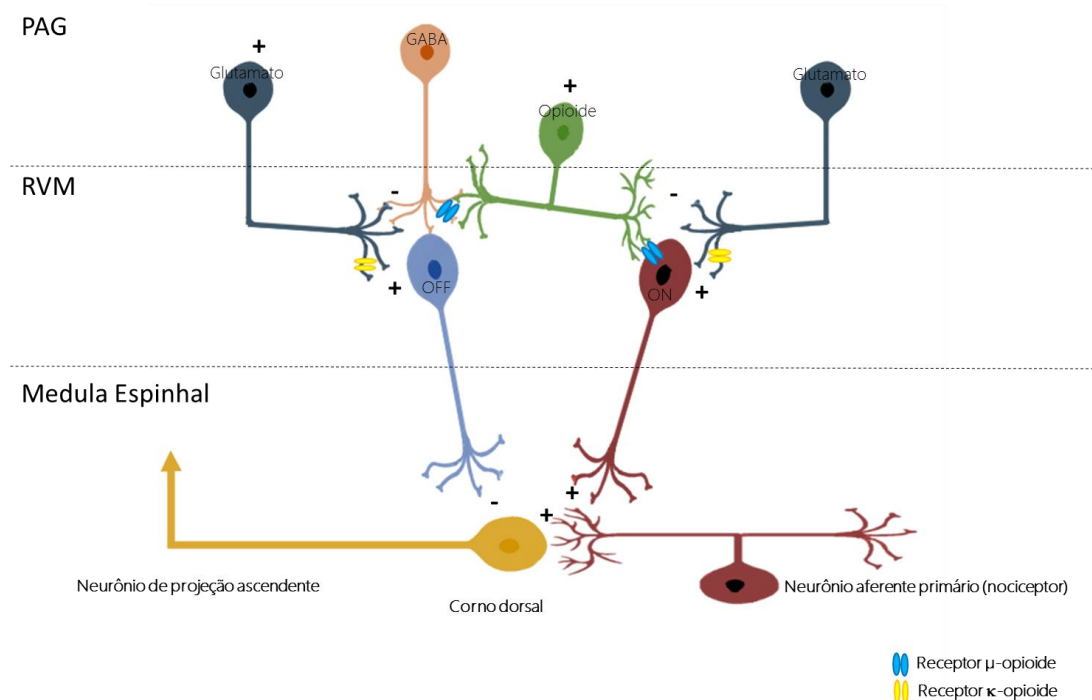


Figura II - Representação esquemática da distribuição sináptica de receptores opioides nas células "On" e "Off" do RVM e suas projeções para a medula espinal. Receptores μ -opioide estão localizados no soma das células "On" (facilitatórias) e nas terminações dos neurônios GABAérgicos - que inibem as células "Off" (inibitórias). Quando ativados, os receptores μ -opioide inibem as células "On" e desinibem as células "Off" e com isto produzem efeito antinociceptivo. Receptores κ -opioide estão localizados nas terminações de neurônios glutamatérgicos que excitam tanto células "On" como células "Off", isto é podem exercer efeito pró ou antinociceptivo dependendo de onde forem ativados. No corno dorsal as células "On" podem aumentar (facilitar) a entrada nociceptiva enquanto as células "Off" podem inibir o neurônio de projeção ascendente. GABA = ácido γ -aminobutírico. Figura adaptada de Fields (2004).

O controle nociceptivo ascendente medeia uma forma de analgesia induzida por estimulação nociceptiva que pode ser evidenciada em uma região distante daquela onde o estímulo foi aplicado (antinocicepção heterosegmental) e é semelhante à desencadeada por uma alta dose de morfina (10 mg/kg) (Gear et al., 1999). Por exemplo, a imersão da pata traseira em água quente, ou a injeção subdérmica de capsaicina induz antinocicepção demonstrada pela atenuação do reflexo de abertura bucal (resposta reflexa dos músculos mastigatórios à

estimulação nociceptiva do dente incisivo) (Gear et al., 1999) ou pela diminuição do comportamento nociceptivo na resposta da formalina orofacial (Tobaldini et al., 2014).

Assim sendo, foi proposto que a estimulação nociceptiva periférica (causada pela injeção de capsaicina ou pela água quente) é o estímulo que desencadeia um complexo mecanismo espinhal, que através de sinapses inibitórias e excitatórias, culmina na inibição de uma atividade tônica ascendente e induz antinocicepção (para detalhes sobre os mecanismos espinais envolvidos no ANC ver, Tambeli et al., 2002; Tambeli et al., 2003a; Tambeli et al., 2003b). Em contrapartida, pouco se sabe sobre os mecanismos supraespinhais envolvidos no controle nociceptivo ascendente. Todavia, o núcleo accumbens (NAc) - uma estrutura mesolímbica prosencefálica localizada no estriado ventral - apresenta participação proeminente nesta circuitaria (ver localização na Figura 1). Isto porque a administração de antagonista opioide μ , δ ou não seletivo bloqueia a analgesia induzida pelo controle nociceptivo ascendente, assim como a administração de antagonista colinérgico nicotínico ou dopaminérgico no NAc também (Gear et al., 1999; Schmidt et al., 2002a; Schmidt et al., 2001; Schmidt et al., 2002b). Além disso, a administração de antagonista de receptores colinérgicos nicotínicos no RVM (Gear & Levine, 2009) também é capaz de bloquear a analgesia induzida por estimulação nociceptiva. O envolvimento de outras regiões supraespinhais não é conhecido. Dados em análise por nosso laboratório indicam um possível envolvimento de áreas como a área tegmental ventral, da substância negra e da amígdala na analgesia induzida pelo controle nociceptivo ascendente.

Embora a analgesia induzida pela ativação do controle nociceptivo ascendente pareça, em alguns aspectos, àquela induzida pela ativação do DNIC (do inglês *Diffuse Noxious Inhibitory Control*) ou a analgesia do CPM (do inglês, *Conditioned Pain Modulation*) - termos utilizados para referir a analgesia causada por dor em animais e em humanos respectivamente (Nir & Yarnitsky, 2015) – estas diferem do controle nociceptivo ascendente em alguns aspectos. Os efeitos do DNIC/CPM são de curta-duração e dependem da manutenção da estimulação nociva, desaparecendo rapidamente após cessar o estímulo (para revisão, Pud et al. (2009). Em contraste, a analgesia do controle nociceptivo ascendente perdura por mais de uma hora e uma vez iniciada se torna independente de nova estimulação (Tambeli et al., 2009). Além disso, a analgesia do DNIC/CPM é dependente de

mecanismos caudais ao RVM, mais especificamente na região do subnúcleo reticular dorsal (ver localização na Figura I) (Le Bars, 2002; Ossipov et al., 2010). Enquanto o controle nociceptivo ascendente é a única forma de analgesia induzida por dor que depende de mecanismos no prosencéfalo (Gear et al., 1999).

3 RELAÇÃO ENTRE O CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE E O SISTEMA DESCENDENTE PAG-RVM

Estudos prévios tentaram demonstrar alguma comunicação entre este sistema ascendente de modulação da dor com o sistema descendente PAG-RVM, porém todos falharam neste propósito. Isto porque a administração de naloxona (antagonista não seletivo de receptor opioide) intra-PAG ou intra-RVM não afeta a analgesia induzida pelo controle nociceptivo ascendente (Gear et al., 1999; Gear & Levine, 1995). Além disso, até onde sabemos, não há evidências que demonstrem uma ligação entre o sistema mesolímbico (e conseqüentemente o NAc) e o descendente de modulação da dor; ou entre PAG-RVM e os mecanismos de analgesia induzidos por dor.

Dados obtidos recentemente por nosso grupo em relação ao controle nociceptivo ascendente nos conduziram de volta a este tema. Entre eles está o estudo de que o controle nociceptivo ascendente facilita comportamentos defensivos em ratos (Tambeli et al., 2012), provavelmente por deixar o animal com analgesia suficiente para se envolver em respostas defensivas. Outro estudo demonstra que o controle nociceptivo ascendente medeia o efeito analgésico da acupuntura (Tobaldini et al., 2014), isto é, o agulhamento em ponto de acupuntura ativa fibras nociceptivas do tipo-C que por sua vez culminam na ativação de mecanismos centrais relacionados ao controle nociceptivo ascendente levando a analgesia. O fato é que ambas as expressões de comportamentos, defensivos e de analgesia induzida por acupuntura, são conhecidos por serem dependentes do sistema descendente PAG-RVM (Harris, 1996; Zhao, 2008). Isto nos leva a hipótese de que o controle nociceptivo ascendente serve de link entre a estimulação nociceptiva e o recrutamento do mais potente sistema endógeno de modulação da dor, o sistema descendente PAG-RVM. Portanto, o objetivo deste trabalho é fornecer suporte funcional para esta hipótese.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a possível relação entre o controle nociceptivo ascendente com o sistema descendente PAG-RVM.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Testar se a ativação do controle nociceptivo ascendente, através da injeção de capsaicina, é capaz de induzir analgesia no modelo de hiperalgesia inflamatória causado por injeção de carragenina na pata.

➤ Realizar o bloqueio específico do controle nociceptivo ascendente e verificar se o mesmo é capaz de bloquear a analgesia da injeção da capsaicina neste modelo de dor inflamatória.

➤ Investigar o envolvimento do mecanismo dopaminérgico mesolímbico ao nível do NAc na analgesia induzida pela injeção de capsaicina.

➤ Verificar se o bloqueio com lidocaína na PAG e no RVM afeta a analgesia induzida pela injeção de capsaicina.

➤ Verificar se o bloqueio específico dos receptores envolvidos com a via descendente ao nível da PAG e do RVM afeta a analgesia induzida pela injeção de capsaicina

➤ Verificar a importância da integridade da via descendente para a modulação da analgesia mediada pelo controle nociceptivo ascendente.

➤ Verificar se o bloqueio da atividade da via descendente ao nível espinal afeta a analgesia mediada pelo controle nociceptivo ascendente.

➤ Mensurar a atividade neuronal no NAc, PAG e RVM quando o controle nociceptivo ascendente está ativado ou não.

5 MÉTODOS

ANIMAIS UTILIZADOS

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos (270-300 g), alojados cinco por gaiola com acesso livre ao alimento e à água. Eles foram mantidos em uma sala com ciclo claro:escuro de 12h cada, com temperatura controlada (± 23 °C). Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (protocolo nº 782) e seguiram as diretrizes dos Padrões de Ética em experimentação animal da Associação Internacional para o Estudo da Dor e do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

DROGAS UTILIZADAS

Capsaicina (250 μ g), agonista do receptor TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide-1) inicialmente diluída em tween-80 (50%) e etanol (50%) para uma concentração de 50 μ g/ μ l e então diluída em salina (NaCl 0,9%) até a concentração para uso em experimento (Gear et al., 1999); carragenina- λ (20 ou 100 μ g) (Bonet et al., 2013); morfina (5 mg/kg), agonista de receptor opioide (Ozdemir et al., 2012); [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin (DAMGO, 0,3 μ g), agonista de receptor μ -opioide (Schmidt et al., 2002b); Cys²,Tyr³,Orn⁵,Pen⁷amide (CTOP, 0,5 μ g), antagonista de receptor μ -opioide (Tobaldini et al., 2014); mecamilamina (0,6 μ g), antagonista de receptor nicotínico colinérgico (Gear & Levine, 2009); lidocaína N-ethyl bromide salt (QX-314, 2%), derivado quaternário da lidocaína (Song et al., 2013); muscimol (10 ng), agonista de receptor GABA_A (Gear et al., 1999); WAY100135 (46 μ g), antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A} de serotonina (Holden et al., 2005); tropisetron (10 μ g), antagonista seletivo de receptor 5-HT₃ de serotonina (Alloui et al., 2002); idazoxan (50 μ g), antagonista seletivo de receptor α ₂-adrenérgico (Silva et al., 2011); raclopride (1 ou 10 μ g para injeção intra-NAc; ou 5 μ g para injeção intratecal), antagonista seletivo de receptor D₂ dopaminérgico (Millan, 2002; Viisanen et al., 2012); SCH23390 (SCH, 1,8 μ g), antagonista seletivo de receptor D₁ dopaminérgico (Schmidt et al., 2002a).

Todas as drogas foram dissolvidas em salina e obtidas da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) exceto WAY100135 o qual foi obtido da Tocris Bioscience (Bristol, UK).

PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS

Os procedimentos cirúrgicos descritos abaixo foram realizados nos animais previamente anestesiados (solução de xilazina 10 mg/Kg e cetamina 60 mg/kg, intraperitoneal). Após a cirurgia todos os animais receberam dipirona (30 mg/Kg, intramuscular) e enrofloxacino (0,5 mg/Kg, subcutâneo). Animais que exibissem algum prejuízo motor após a cirurgia foram excluídos dos experimentos adicionais.

CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os ratos foram posicionados em um instrumento estereotáxico, o crânio foi exposto e um pequeno orifício foi feito para introduzir uma cânula guia de calibre 26G dentro do NAc core; PAG ventrolateral ou RVM. Para o NAc core, as coordenadas foram a partir de bregma: 1,3 mm rostral, 7,2 mm dorsoventral e $\pm 1,8$ mm lateral, com a barra de incisivo a 3,3 mm (Tobaldini et al., 2014). Para a PAG ventrolateral, as coordenadas foram de lambda: 0 mm anteroposterior, -2 mm lateral e 5,4 mm dorsoventral com um ângulo de $1,8^\circ$ e a barra do incisivo a 2,5 mm (Tomim et al., 2016). Para o RVM, as coordenadas foram da linha inter-aural: 2,3 mm caudal e 0,2 mm ventral (Tobaldini et al., 2014). A cânula foi então fixada no crânio com um parafuso e cimento dental. Os experimentos foram realizados 7-9 dias após as cirurgias.

LESÃO DO FUNÍCULO DORSOLATERAL

A lesão do funículo dorsolateral (DLF) foi realizada como descrito anteriormente (Tomim et al., 2016). Resumidamente, uma laminectomia foi realizada no nível torácico de T1-T3 para expor a medula espinhal usando uma broca de osso sob um microscópio cirúrgico. A lesão foi feita cortando uma porção do quadrante dorsolateral da medula espinhal com uma agulha curvada de calibre 26G. Após a hemostasia, as incisões cirúrgicas foram fechadas e os animais ficaram em recuperação cirúrgica durante 28 dias antes do experimento. A lesão falsa (sham DLF) foi realizada expondo as vértebras sem seccionar nenhum tecido neural.

O local da lesão e a extensão foram avaliados histologicamente em cada animal após os experimentos. Os ratos foram perfundidos transcardiacamente com

solução salina seguida de 4% de formaldeído. As medulas espinhais foram removidas ao nível das lesões e processadas histologicamente (secções de 50 μm , coradas com vermelho neutro 1%) para permitir a verificação microscópica da extensão e localização da lesão.

MODELO COMPORTAMENTAL - PARA ESTUDAR A ANALGESIA MEDIADA PELO CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE

O controle nociceptivo ascendente foi estudado em animais anestesiados (Gear & Levine, 1995) e acordados (Gear et al., 1999) usando diferentes estratégias experimentais, sempre caracterizadas pela aplicação do estímulo nociceptivo (para induzir analgesia) em uma região do corpo longe de onde é aplicado o estímulo teste (para detectar analgesia). Isso garante que o teste nociceptivo seja realizado em um segmento remoto do local da estimulação nociceptiva, eliminando efeitos intrasegmentais que possam influenciar os ensaios. Por exemplo, o estímulo nociceptivo, comumente uma injeção de capsaicina, pode ser aplicado na pata traseira e a analgesia ser observada no teste de formalina orofacial (Tobaldini et al., 2014).

No presente estudo, avaliou-se o efeito antinociceptivo induzido por uma injeção da capsaicina na pata dianteira no modelo de dor inflamatória induzida por injeção de carragenina na pata traseira (Araldi et al., 2013) (ver Figure 1 para o detalhes do delineamento experimental). Com este objetivo, a carragenina (100 μg) ou o seu veículo foram injetados na pata traseira esquerda. Três horas depois, quando a hiperalgisia induzida por carragenina é máxima (Bonet et al., 2013), a capsaicina (250 μg) ou seu veículo foi injetada na pata dianteira para ativar o controle nociceptivo ascendente (Gear et al., 1999). A capacidade da injeção de capsaicina na pata dianteira em diminuir a hiperalgisia induzida por carragenina na pata traseira foi testada ao longo do tempo até o efeito antinociceptivo desaparecer. As microinjeções cerebrais ou injeções intratecal lombar (para bloquear mecanismos de modulação da dor endógena), quando necessárias, foram realizadas imediatamente antes da injeção da capsaicina na pata dianteira.

INJEÇÕES DE DROGAS

Injeções na pata

Seguindo o protocolo detalhado acima, os animais foram gentilmente contidos para receber uma injeção na pata traseira (30 μ L) de carragenina ou seu veículo, seguida, 3 horas depois, por uma segunda injeção desta vez na pata dianteira (30 μ L) de capsaicina ou seu veículo. As injeções foram realizadas na superfície dorsal das patas usando uma agulha de calibre 26G conectada a uma cânula de polietileno PE-50 e também a uma microseringa Hamilton de 50 μ L.

Microinjeções intracérebro

As microinjeções foram realizadas inserindo uma cânula de injeção de aço inoxidável de calibre 30G através das cânulas guia implantadas estereotaxicamente. A cânula de injeção foi conectada a um tubo de polietileno PE-10 e também a uma seringa Hamilton de 2 μ l. O volume de injeção foi de 0,3 μ L realizado ao longo de um período de 60 segundos, e deixada no local por mais 30 segundos após a injeção, para minimizar o refluxo ao longo do trato da cânula.

Os locais de injeção foram verificados histologicamente em cada animal após os experimentos. Sob anestesia, o corante azul de Evans (1%, 0,5 μ l) foi microinjetado e os ratos foram perfundidos transcardiacamente com solução salina seguida de 4% de formaldeído. Secções coronais (50 μ m) foram realizadas para permitir a verificação microscópica da localização e a distribuição do corante (Paxinos & Watson, 2007). Apenas os animais nos quais o corante foi restrito ao núcleo selecionado foram incluídos nas figuras e na análise de dados, os demais foram excluídos.

Injeção intratecal

A administração de drogas no espaço intratecal foi realizada como descrito anteriormente (Bonet et al., 2013; Dall'Acqua et al., 2014). Brevemente, os ratos foram anestesiados por inalação de isoflurano e uma pequena área que recobre a região lombar foi tricotomizada. Para a injeção, os ratos foram posicionados em decúbito ventral com a região ilíaca descansando em um tubo falcon. Uma agulha de calibre 26G foi inserida no espaço subaracnóideo na linha média entre vértebras L5 e L6 e um movimento da cauda foi usado como indicador do posicionamento preciso da agulha. As injeções foram realizadas em um volume de 5 μ L (1 μ L/s). Os animais recuperaram a consciência aproximadamente 1 minuto após a interrupção do anestésico.

TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados durante ciclo claro (entre 9:00 da manhã e 5:00h da tarde), em uma sala silenciosa mantida a 23°C e cada animal foi utilizado uma única vez. Os animais foram habituados às condições experimentais previamente.

Teste mecânico de retirada de pata

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste Randall-Selitto (Randall & Selitto, 1957) (aparelho Randall-Selitto, Insight, Ribeirão Preto, Brasil), a sua diminuição foi utilizada como medida de hiperalgesia (nocicepção), enquanto seu aumento como medida de analgesia (antinocicepção). Neste teste, uma pressão crescente (peso em gramas) é aplicada na superfície dorsal da pata traseira do rato até o animal retirar a sua pata. Os valores em gramas obtidos a partir da média de três leituras (realizada em intervalos de dois minutos) representam o limiar nociceptivo mecânico. Para evitar lesões teciduais ao atingirem o valor de 240g os animais eram retirados do teste. Os dados foram expressos em figuras como variação (após - antes) do valor basal (pré-experimento) ao longo do tempo após as intervenções.

Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi usado para fornecer uma indicação geral da atividade locomotora, descartando a possibilidade de que as microinjeções ou que os procedimentos cirúrgicos afetassem o comportamento motor dos animais e sua resposta aos testes nociceptivos.

A arena de campo aberto consiste em uma área circular (90 cm de diâmetro), dividida em 12 quadrantes, limitada por uma parede externa de 50 cm de altura. O comportamento exploratório foi quantificado pelo número de quadrantes cruzados durante 1 minuto. O teste foi realizado entre 30 e 60 minutos do tempo experimental (ver Figure 1).

IMUNOHISTOQUÍMICA PARA C-FOS

Os ratos foram perfundidos transcardiacamente, sob anestesia geral, com salina seguido de formaldeído a 4% em tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,4. Os

encéfalos foram removidos e posteriormente imersos durante 1 semana em formaldeído a 4%. Os encéfalos foram então colocados em 30% de solução de sacarose por 48h antes da secção. Foram realizadas seis secções de 30 µm por animal entre as coordenadas de bregma 1.44 e 1.20 mm para NAc core; entre as coordenadas de bregma -8,04 e -8,28 mm para a PAG ventrolateral; e entre as coordenadas inter-aural -2,16 e -2,40 mm para o RVM (Paxinos & Watson, 2007). As secções de tecido foram incubadas de modo free-floating a 4°C durante toda a noite com anticorpo primário anti-c-Fos de coelho (1: 500 em solução salina tampão fosfato (PBS) mais 0,3% Triton X-100, Chemicon, EUA). As secções foram então incubadas com um anticorpo secundário conjugado com biotina (1: 500, Vector Laboratories, EUA) durante 2h em temperatura ambiente. Após várias lavagens com PBS, o complexo de anticorpos foi localizado utilizando o sistema ABC (kit Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories), seguido de reação com 3,3'-diaminobenzidina com realce por níquel. As secções foram então montadas sobre lâminas revestidas com gelatina e cobertas por lamínula depois da desidratação por concentrações ascendentes de soluções de etanol-xilol (Tobaldini et al., 2014). As lâminas foram digitalizadas em um scanner de microscópio (Axio Imager Z2, Carl Zeiss, Jena, DE) acoplado a um sistema de imagem (Metasystems, Altlußheim, DE). A quantificação de células imunorreativas de c-Fos (c-Fos-ir) foi realizada automaticamente por densidade óptica numa área delimitada utilizando o software de análise de imagem ImageJ 1.37c (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA - de domínio público).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do limiar nociceptivo mecânico foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas com 1 fator 'within' (tempo) e 1 fator 'between' (tratamento). Os dados da expressão de c-Fos foram analisados por ANOVA de duas vias com 2 fatores 'between' (injeção na pata traseira e pata dianteira). Os dados da locomoção no campo aberto foram analisados por ANOVA de uma via. Se houvessem diferenças significativas entre os grupos, as diferenças eram testadas utilizando o pós teste de Student-Newman-Keuls para determinar a base da diferença significativa em cada caso. O nível de significância estatística foi $p < 0,05$. Os dados estão plotados em figuras como média \pm erro padrão da média. O

software SigmaPlot® (Systat Software, San Jose, CA, EUA) foi utilizado para realizar análise de dados e a representação gráfica.

6 ARTIGO CIENTÍFICO

Pain inhibits pain: An ascending-descending pain modulation pathway linking mesolimbic and classical descending mechanisms

Glaucia Tobaldini; Natalia F. Sardi; Vinicius A. Guilhen; Luana Fischer

^a Department of Physiology, Division of Biological Sciences, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil

Corresponding author:

Luana Fischer, Tel.: +55 41 3361-1738.

E-mail address: fischer@ufpr.br (L. Fischer).

The authors declare no conflict of interest and source of funding

Original Article

Nota: Manuscrito submetido à revista PAIN.

Abstract

The most powerful known pain modulation pathway is the PAG-RVM (periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla) descending system. In this study we hypothesized that it is functionally linked to the ascending nociceptive control, a form of pain-induced analgesia dependent on mesolimbic mechanisms. To test this hypothesis we used a pharmacological approach, in which the antinociception induced by noxious stimulation (forepaw injection of capsaicin) was detected in rat standard model of inflammatory pain (hindpaw injection of carrageenan). This antinociception was blocked by interventions recognized for blocking ascending nociceptive control-mediated analgesia: the blockade of μ -opioid receptors (CTOP, 0.5 μ g) or of dopamine D1 and D2 receptors (SCH23390, 1.8 μ g and raclopride, 5 μ g) within the NAc (nucleus accumbens) as well as the blockade of nicotinic acetylcholine receptors (mecamylamine, 0.6 μ g) within the RVM. This antinociception was also blocked by standard interventions recognized for blocking mechanisms of descending inhibition within either the PAG or the RVM: local acute neuronal blockade (lidocaine, 2%); blockade of μ -opioid receptors (CTOP, 0.5 μ g) or activation of GABA_A receptors (muscimol, 10ng). Consistently, antinociception was similarly blocked by interventions recognized for blocking spinal mechanisms of descending inhibition: lesion of dorsolateral funiculus and the spinal blockade of serotonergic 5HT_{1A} receptors (WAY100135, 46 μ g); 5HT₃ receptors (tropisetron, 10 μ g) or α 2 adrenergic receptors (idazoxan, 50 μ g). Neuronal activity indirectly estimated by c-Fos expression within the NAc, PAG and RVM supports behavioral observations. Therefore, this study provides functional evidences to argue that noxious stimulation triggers an ascending-descending pain modulation pathway linking the mesolimbic system to the PAG-RVM descending system.

Keywords: pain modulation; ascending nociceptive control; periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla descending system; mesolimbic system; nucleus accumbens; PAG; RVM; spinal cord; opioid; dopamine; noxious stimulation; behavior; rat

Summary

An ascending-descending pain modulation pathway triggered by pain and dependent on nucleus accumbens mesolimbic mechanisms and on the PAG-RVM descending system.

Introduction

Acute pain is essential to life; intended to signal potential danger, it draws attention and dominates the behavior. Precisely because of this, the ability to suppress pain perception may be critical to survival as well, and the brain knows how to accomplish this task with admirable perfection. The understanding of the mechanisms by which the brain controls acute pain perception may allow its manipulation to control persistent and chronic pain, the pathological kind of pain that causes suffering and is devoid of biological purpose. In fact, several drugs for pain management act in such mechanisms (Ossipov et al., 2010), however we are still far from efficiently treating pain.

Ever since Melzack & Wall published their remarkable gate control theory of pain (Melzack & Wall, 1965), we have seen great advances in our knowledge about pain modulation mechanisms. In the 1970s and 80s, a series of studies advanced our knowledge about the most well-known circuitry engaged in endogenous pain modulation: the PAG–RVM–descending system. In this system, inputs from multiple forebrain regions are integrated within the periaqueductal gray (PAG), which projects to the rostral ventromedial medulla (RVM), from where descending pathways target the dorsal horn to control nociceptive transmission (reviewed by (Fields, 2004; Millan, 2002)).

More recently, from the 1990s, initial observations that analgesia induced by spinally administered opioids was decreased by opioid receptor antagonists intracerebroventricularly administered (Holmes & Fujimoto, 1992; Miaskowski & Levine, 1992), culminate with the description of an ascending pain modulation pathway (Gear et al., 1999; Gear & Levine, 1995, 2009). Named Ascending Nociceptive Control (Gear et al., 1999), it mediates a form of pain-induced analgesia, in which potent and long-lasting antinociception is induced by opioid- and dopamine-dependent mechanisms within the NAc (nucleus accumbens), the target of the mesolimbic system in the ventral striatum.

Previous attempts have failed to link the ascending nociceptive control to the PAG-RVM descending system, since the administration of the opioid receptor antagonist naloxone into either the PAG or the RVM did not affect the antinociception mediated by ascending nociceptive control activation. In fact, to our knowledge there is no direct evidence linking either mesolimbic and

descending pain modulation mechanisms or the PAG-RVM descending system with pain-induced analgesia. However, some of our recent data obtained on ascending nociceptive control lead us back to this issue. One of them demonstrated that the ascending nociceptive control facilitates defensive behaviors (Tambeli et al., 2012), probably by leaving the subject free from pain and, consequently, free for engaging in defensive responses. The other finding demonstrated that it mediates the analgesic effect of acupuncture (Tobaldini et al., 2014), that is, acupuncture needling activates nociceptive C-fibers and, subsequently, central ascending nociceptive control mechanisms to induce analgesia. The heart of the matter is that both facilitation of defensive behaviors and acupuncture-induced analgesia are mediated by the PAG-RVM descending system (Harris, 1996; Zhao, 2008). Therefore, taking the above data together we hypothesized that the ascending nociceptive control serves as a link between noxious stimulation and the recruitment of the most powerful known mechanism for endogenous pain modulation, the PAG-RVM descending system. The aim of this study is to provide functional support to this hypothesis.

Material and Methods

Animals

The experiments were performed in male Wistar rats (270-300 g), housed five per cages with free access to food and water. They were maintained in a room with controlled 12:12-h light/dark cycle and temperature (± 23 °C). All animal experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Animal Research of the Federal University of Parana (protocol no 782) and followed the guidelines of the Ethics Standards of the International Association for the Study of Pain in animals.

Drugs

Capsaicin (250 μ g), a transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) agonist, was initially dissolved in Tween-80 (50%) and ethanol (50%) to a concentration of 50 μ g/ μ l and then diluted in 0.9% saline (Gear et al., 1999); carrageenan- λ (20 or 100 μ g) (Bonet et al., 2013); morphine (5 mg/kg), an opioid receptor agonist (Ozdemir et al., 2012); [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin (DAMGO, 0.3 μ g), a μ -opioid receptor agonist (Schmidt et al., 2002b); Cys²,Tyr³,Orn⁵,Pen⁷amide (CTOP, 0.5 μ g), a μ -opioid receptor antagonist (Tobaldini et al., 2014); mecamylamine (0.6 μ g), a nicotinic acetylcholine receptor antagonist (Gear & Levine, 2009); lidocaine N-ethyl bromide salt (QX-314, 2%), a quaternary derivative of lidocaine (Song et al., 2013); muscimol (10 ng), a GABA_A receptor agonist (Gear et al., 1999); WAY100135 (46 μ g), a selective serotonin 5-HT_{1A} receptor antagonist (Holden et al., 2005); tropisetron (10 μ g), a selective serotonin 5-HT₃ receptor antagonist (Alloui et al., 2002); idazoxan (50 μ g), a selective α 2-adrenoceptor antagonist (Silva et al., 2011); raclopride (1 or 10 μ g for intra-NAc injection; or 5 μ g for intrathecal injection), a selective dopamine-D2 receptor antagonist (Millan, 2002; Viisanen et al., 2012); SCH23390 (SCH, 1.8 μ g), a selective dopamine-D1 receptor antagonist (Schmidt et al., 2002a). All drugs were dissolved in 0.9% NaCl and obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) except WAY100135 obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Pre-Experimental procedures

Surgical procedures described below were performed in anesthetized rats (xylazine; 10 mg/kg, i.p. and ketamine; 60 mg/kg, i.p.). Dipyrone (30 mg/kg i.m.) and enrofloxacin (0.5 mg/kg s.c.) were administered post-surgically. Rats exhibiting any signal of motor impairment in the open-field test were excluded from additional testing.

Stereotaxic Surgery

The rats were placed in a stereotaxic instrument, the skull was exposed and a small hole was made to introduce a 26-gauge guide cannula within the NAc core; ventrolateral PAG or RVM. For the NAc core the coordinates were from bregma: 1.3 mm rostral, 7.2 mm dorsoventral, and ± 1.8 mm lateral with incisor bar at 3.3 mm (Tobaldini et al., 2014). For the ventrolateral PAG, the coordinates were from lambda: 0 mm anteroposterior, -2 mm lateral, and 5.4 mm dorsoventral, with a 1.8° angle and the incisor bar at 2.5 mm (Tomim et al., 2016). For the RVM, the coordinates were from the intra-aural line: 2.3 mm caudal and 0.2 mm ventral (Tobaldini et al., 2014). The cannula was then fixed to the skull with a screw and dental cement. Experiments were performed 7–9 days later.

Lesion of the dorsolateral funiculus

Lesion of the dorsolateral funiculus (DLF) was performed as previously described (Tomim et al., 2016). Briefly, a laminectomy was performed at the T1–T3 level to expose the spinal cord using a bone drill under a surgical microscope. The lesion was made by cutting a portion of the dorsolateral quadrant of the spinal cord with a 26-gauge curved needle. After hemostasis, the wounds were closed and the animals were allowed to recover for 28 days before the experiment. Sham DLF was performed by exposing the vertebrae without cutting any neuronal tissue.

Lesion location and extension was histologically assessed in each animal after experiments. The rats were transcardially perfused with saline followed by 4% formaldehyde. The spinal cords were removed, at the level of the lesions, and histologically processed (50 μ m sections stained with 1% neutral red) to allow the microscopic verification of lesion extension and location.

Behavioral model to study Ascending nociceptive control-mediated analgesia

The ascending nociceptive control has been studied in anesthetized (Gear & Levine, 1995) and awake (Gear et al., 1999) animals by using different experimental strategies, always characterized by applying the noxious stimulus (to induce analgesia) in a body region far from where the test stimulus (to detect analgesia) is applied. This ensures that nociceptive testing is performed segmentally remote from the site of noxious stimulation, eliminating intrasegmental effects that might influence assays. For example, the noxious stimulus, commonly a capsaicin injection, can be applied into the hindpaw and analgesia detected in the orofacial formalin test (Tobaldini et al., 2014).

In the present study, the antinociceptive effect induced by a forepaw injection of capsaicin was evaluated in the carrageenan model (Araldi et al., 2013) of hindpaw inflammatory pain (see Figure 1 for experimental design). With this purpose, carrageenan (100 µg) or its vehicle was injected in the hindpaw. Three hours later, when carrageenan-induced hyperalgesia is maximal (Bonet et al., 2013), capsaicin (250 µg) or its vehicle was injected in the forepaw to activate the ascending nociceptive control (Gear et al., 1999). The ability of the forepaw injection of capsaicin to decrease carrageenan-induced hyperalgesia in the hindpaw was tested over time until the antinociceptive effect wore off. Whenever brain microinjections or lumbar intrathecal injections were necessary (to block endogenous pain modulation mechanisms), they were performed immediately before the forepaw injection of capsaicin.

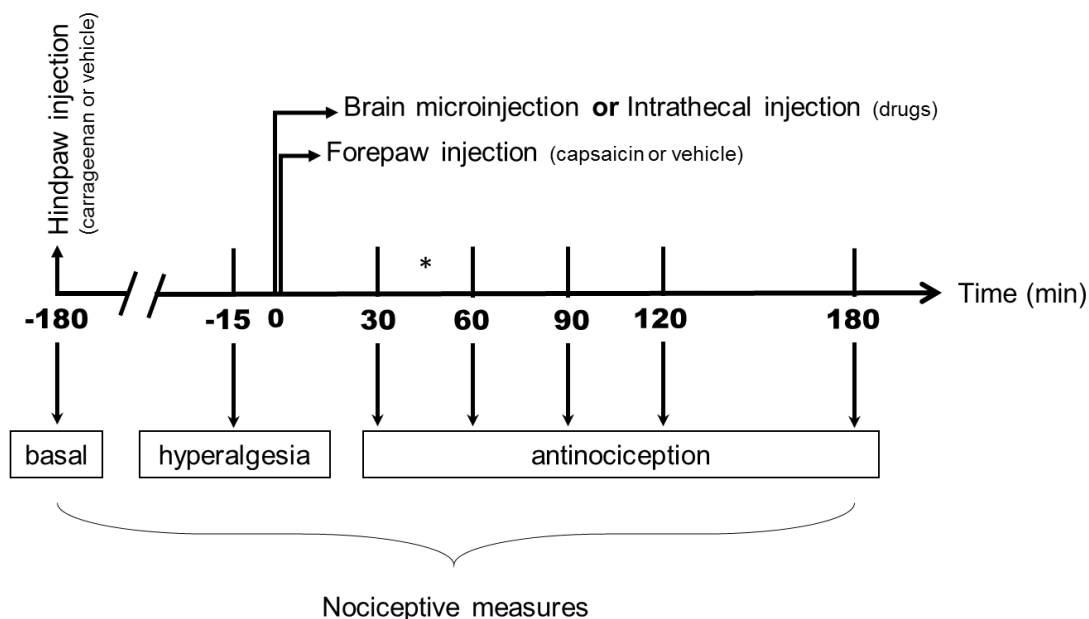


Figure 1. Experimental design. The total duration of the experiments was 360 minutes (6 hours). Negative values in the experimental timeline represent experimental interventions performed before forepaw injection. Positive values represent interventions performed after forepaw injection. Down arrows along the timelines indicate the sequence of nociceptive measurements. Up arrows indicate injection procedures. The symbol “*” indicates when the open field test was performed. The boxes at the bottom describe the expected effect of key interventions: carrageenan-induced hyperalgesia and capsaicin-induced antinociception

Drugs Injections

Paw Injections

Following the protocol detailed above, animals were gently held to receive a hindpaw injection (30 μ L) of carrageenan or its vehicle, followed 3 hours later by a forepaw injection (30 μ L) of capsaicin or its vehicle. The injections were performed into the dorsal surface of the paws using a 26-gauge needle connected to a PE-50 cannula and also to a 50- μ L Hamilton syringe.

Brain Microinjections

Microinjections were performed by inserting a 30-gauge stainless steel injection cannula through the guide cannulas stereotaxically implanted. The injection cannula was connected to a PE-10 polyethylene tube and also to a 2- μ L Hamilton syringe. Injection volume was 0.3 μ L carried out over a period of 60 seconds, after which injection cannula was left in place for 30 more seconds to minimize backflow along the cannula tract. Injection sites were histologically

verified in each animal after experiments. Under anesthesia, Evans blue dye (1%, 0.5 μ l) was microinjected and the rats were transcardially perfused with saline followed by 4% formaldehyde. Coronal sections (50 μ m) were performed to allow the microscopic verification of dye location and spread (Paxinos & Watson, 2007). Only animals in which the dye was restricted to the selected nucleus were included in the figures and data analysis.

Intrathecal Drug Administration

Intrathecal drug administration was performed as previously described (Bonet et al., 2013; Dall'Acqua et al., 2014). Briefly, rats were anesthetized by inhalation of isoflurane and a small skin area overlying the lumbar region was shaved with an electric razor. For injection, rats were positioned in dorsal recumbency with the iliac region resting on a falcon tube. A 26-gauge needle was inserted in the subarachnoid space on the midline between L5 and L6 vertebrae and a flick of the tail was used as indicator of the precise positioning. The injections were performed at a volume of 5 μ L (1 μ L/s). The animals regained consciousness approximately 1 minute after discontinuing the anesthetic.

Behavioral Testing

Behavioral testing was performed during the light phase (between 9:00 a.m. and 5:00 p.m.), in a quiet room maintained at 23°C and each animal was used once. The animals were habituated to the experimental conditions.

Mechanical paw withdrawal test

The mechanical nociceptive threshold was assessed by the Randall–Selitto test (Randall & Selitto, 1957) (Randall-Selitto apparatus, Insight, Ribeirão Preto, Brazil), its decrease was used as a measure of hyperalgesia (nociception), while its increase as a measure of analgesia (antinociception). In this test, an increasing pressure (weight in grams) is applied to the dorsal surface of the rat's hindpaw until the animal withdrew its paw. The value in grams obtained from the mean of three readings (performed in intervals of two minutes in a blinded fashion) represents the mechanical nociceptive threshold.

Data were expressed in figures as variation (after – before) from the basal (pre-experiment) value over time following interventions.

Open-Field Test

The open-field test was used to provide an overall indication of locomotor activity, discarding the possibility that microinjections or surgery procedures affected animals' motor behavior and their response to the nociceptive tests. The open-field arena consists of a circular area (90 cm of diameter), divided into 12 squares, limited by a 50-cm-high wall. The exploratory behavior was quantified by the number of crossed squares during 1 minute. The test was performed between 30 and 60 minutes of the experimental time-course (see Figure 1).

c-Fos Immunohistochemistry

The rats were transcardially perfused, under general anesthesia, with 0.9% NaCl followed by 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed and subsequently immersed for 1 week in formaldehyde at 4%. The brains were then placed in 30% sucrose solution for 48 h before sectioning. Six sections of 30 μ m per animal were taken between bregma 1.44 and 1.20-mm coordinates to NAc; between bregma –8.04 and –8.28-mm coordinates to ventrolateral PAG; and between interaural –2.16 and –2.40-mm coordinates to RVM (Paxinos & Watson, 2007). Tissue sections were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-c-Fos primary antibody (1:500 in phosphate buffer saline (PBS) plus 0.3% Triton X-100; Chemicon, USA). Sections were then incubated with a biotin-conjugated secondary antibody (1:500, Vector Laboratories, USA) for 2 h at room temperature. After several washes with PBS, the antibody complex was localized using the ABC system (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories) followed by reaction with 3,3'-diaminobenzidine with nickel enhancement. The sections were then mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped after dehydration by ascending concentrations of ethanol–xylene solutions (Tobaldini et al., 2014). The slides were digitized with a microscope scanner (Axio Imager Z2, Carl Zeiss, Jena, DE) coupled to an imaging system (Metasystems, Altlussheim, DE). Quantification of c-Fos

immunoreactive (c-Fos-ir) cells was performed automatically by optical density in an area delimited using ImageJ 1.37c (Public Domain) image analysis software.

Statistical Analysis

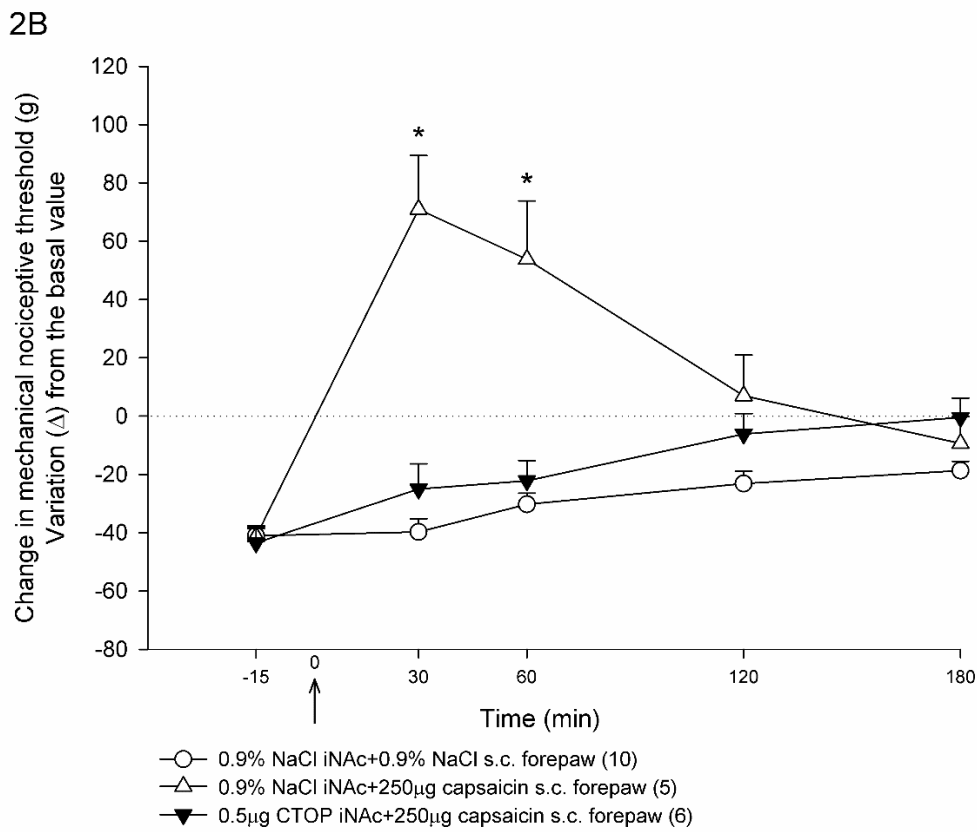
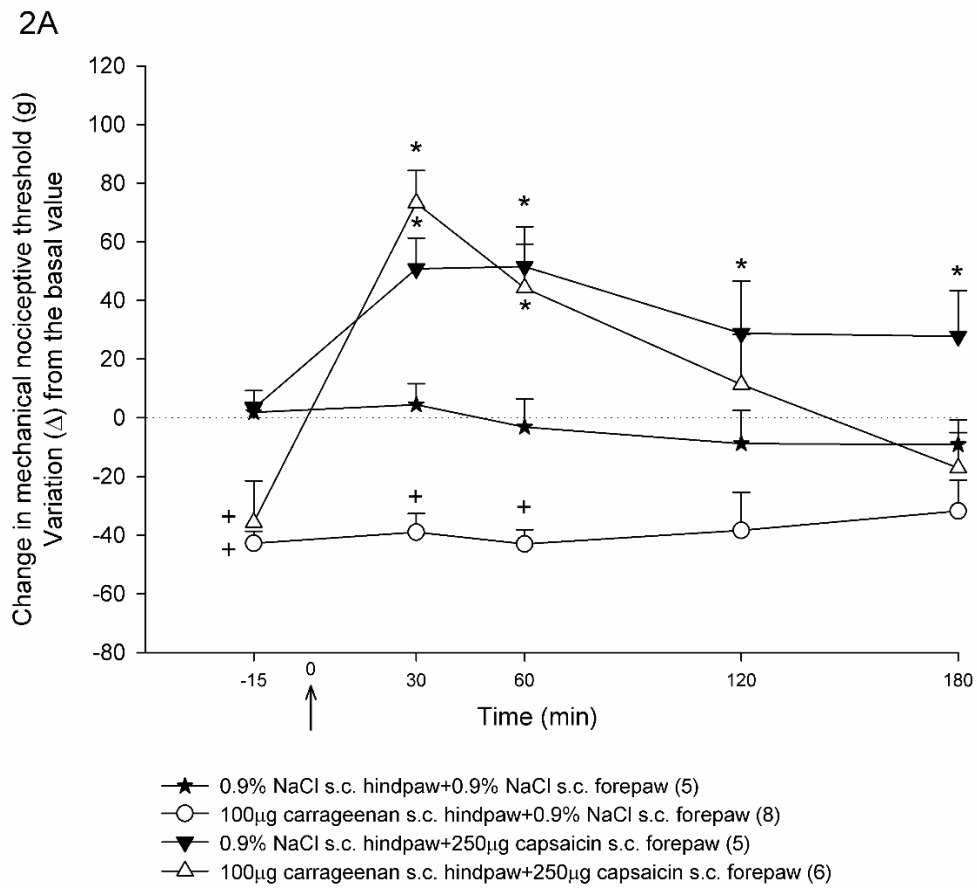
Data from mechanical nociceptive threshold were analyzed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) with 1 within-subjects factor (time) and 1 between-subjects factor (treatment). Data from c-Fos expression were analyzed by ANOVA with 2 (hindpaw and forepaw injections) between-subjects factor. Data from locomotion in the open field were analyzed by one-way ANOVA. If there were significant differences between groups, post-hoc contrasts, using the Student-Newman-Keuls test were performed to determine the basis of the significant difference in each case. The level for statistical significance was $p < 0.05$. Data are plotted in figures as mean \pm S.E.M. SigmaPlot® software (Systat Software, San Jose, CA, USA) was used to perform data analysis and graphical representation.

Results

Activation of ascending nociceptive control blocks carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia.

The subcutaneous administration of carrageenan into the hindpaw significantly decreased the mechanical nociceptive threshold, which is referred as hyperalgesia (Figure 2A, $p = 0.003$, shown in figures as the decrease in paw withdrawal threshold from the basal (pre-injection) value). The effect of noxious stimulation on carrageenan-induced hyperalgesia was tested by injecting capsaicin, at a dose known to activate the ascending nociceptive control, into the forepaw. Capsaicin not only reversed the hyperalgesia induced by carrageenan ($p < 0.001$), but also induced a potent antinociceptive effect, which can also be seen in animals receiving vehicle (0.9% NaCl, $p = 0.02$) instead of carrageenan into the hindpaw (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 2A: $F_{\text{treatment}} (3,20) = 17.397$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (12,80) = 4.463$, $p < 0.001$). The effect of capsaicin in carrageenan-induced hyperalgesia was similar in magnitude and time-course to that induced by a standard systemic dose of morphine (5 mg/Kg, repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S1: $F_{\text{treatment}} (2,16) = 16.370$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (8,64) = 7.350$, $p < 0.001$).

To make sure that the antinociceptive effect of noxious stimulation with capsaicin depends on ascending nociceptive control activation, we blocked its mechanisms within the NAc and the RVM. The administration of a μ -opioid receptor antagonist (CTOP) into the NAc, at a dose known to block the ascending nociceptive control, prevented ($p = 0.002$) the antinociceptive effect induced by capsaicin (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 2B: $F_{\text{treatment}} (2,18) = 13.715$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (8,66) = 14.728$, $p < 0.001$). Similarly, the co-administration of a dopamine D1 (SCH23390) and D2 (raclopride) receptor antagonists into the NAc prevented ($p = 0.013$) capsaicin-induced antinociception, while each antagonist alone had an intermediate effect (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 2C: $F_{\text{treatment}} (4,31) = 4.753$, $p < 0.004$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (16,119) = 6.505$, $p < 0.001$).



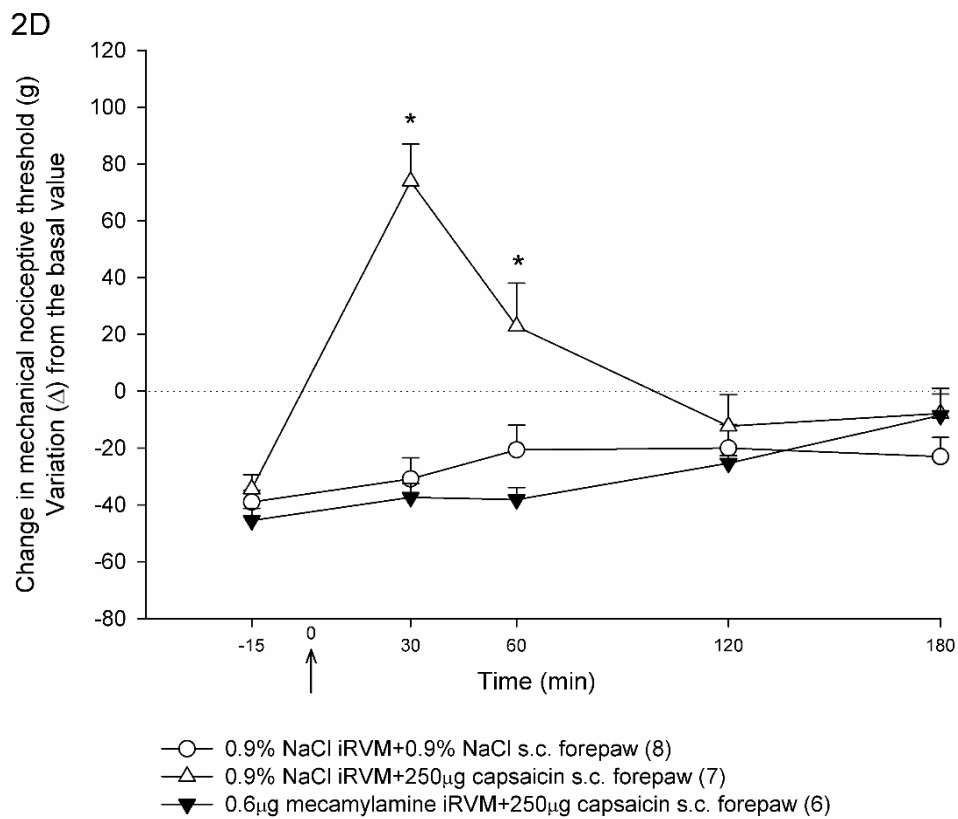
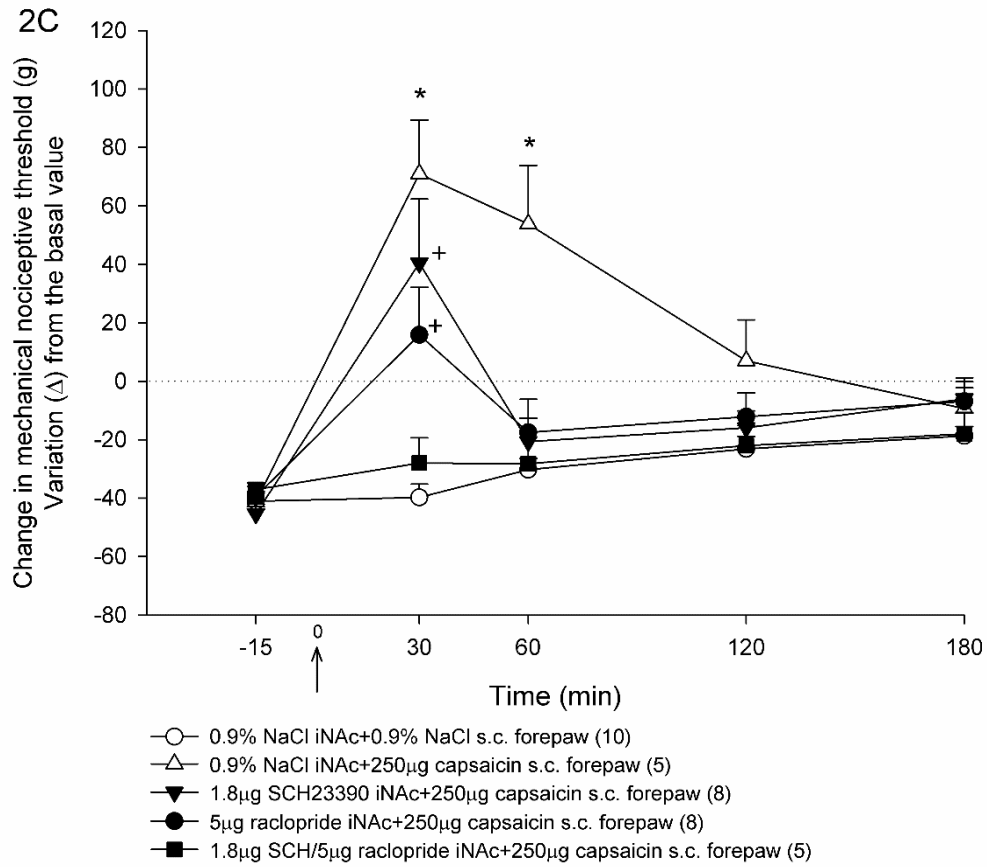


Figure 2. Capsaicin-induced antinociception on carrageenan-induced hyperalgesia depends on μ -opioid and dopamine receptors within NAc and nicotinic acetylcholine receptors within RVM. (A) The hindpaw injection of carrageenan (100 μ g) significantly decreased the mechanical nociceptive threshold (indicated by the symbol “+”). The forepaw injection of capsaicin (250 μ g) significantly increased mechanical nociceptive threshold either in animals that have received carrageenan or saline into the hindpaw (indicated by the symbol “**”). (B) Capsaicin-induced antinociception in animals that have received the hindpaw injection of carrageenan (indicated by the symbol “**”) was prevented by the administration of CTOP (μ -opioid receptor antagonist) or by the (C) co-administration of SCH23390 and raclopride (D1 and D2 dopamine receptor antagonists, respectively). The symbol “+” in this panel indicates the intermediate effect of each antagonist alone) into the NAc as well as by (D) mecamylamine (nicotinic acetylcholine receptor antagonist) into the RVM (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$). See Supplementary Figure S2 and results section for details regarding the effect of the antagonists by themselves on carrageenan-induced hyperalgesia. In this and in subsequent figures data represent the change in mechanical nociceptive threshold (g) as a variation from basal value (after-before). Numbers in parenthesis indicate the number of animals in each group. See methods for additional details regarding data presentation and analysis. iNAc = intra-nucleus accumbens; iPAG = intra-periaqueductal gray; iRVM = intra-rostral ventromedial medulla.

Although the standard dose of carrageenan (100 μ g) induces an intense hyperalgesic response, optimal to evaluate the efficacy of antinociceptive strategies in inflammatory pain, the decrease in paw withdrawal threshold is close to the test limit. For this reason, the effect of each drug by itself on carrageenan-induced hyperalgesia was evaluated using a lower dose of carrageenan (20 μ g). This dose induces an intermediate decrease in paw withdrawal threshold, optimal to observe any tendency of drugs to further decrease (or increase) mechanical nociceptive threshold (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 A: $F_{\text{treatment}}(2,18) = 11.219, p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(8,72) = 1.025, p = 0.426$). By themselves, neither CTOP nor the combination of raclopride and SCH23390 (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 B: $F_{\text{treatment}}(2,10) = 0.679, p = 0.529$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(8,39) = 1.091, p = 0.390$) affected carrageenan-induced hyperalgesia.

The administration of a nicotinic acetylcholine receptor antagonist (mecamylamine) into the RVM, at a dose known to block the ascending nociceptive control, prevented ($p = 0.003$) capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 2D: $F_{\text{treatment}}(2,18) = 8.784, p = 0.002$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(8,68) = 12.956, p < 0.001$). By itself, the administration of mecamylamine into the RVM, did not change carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures ANOVA and Student-

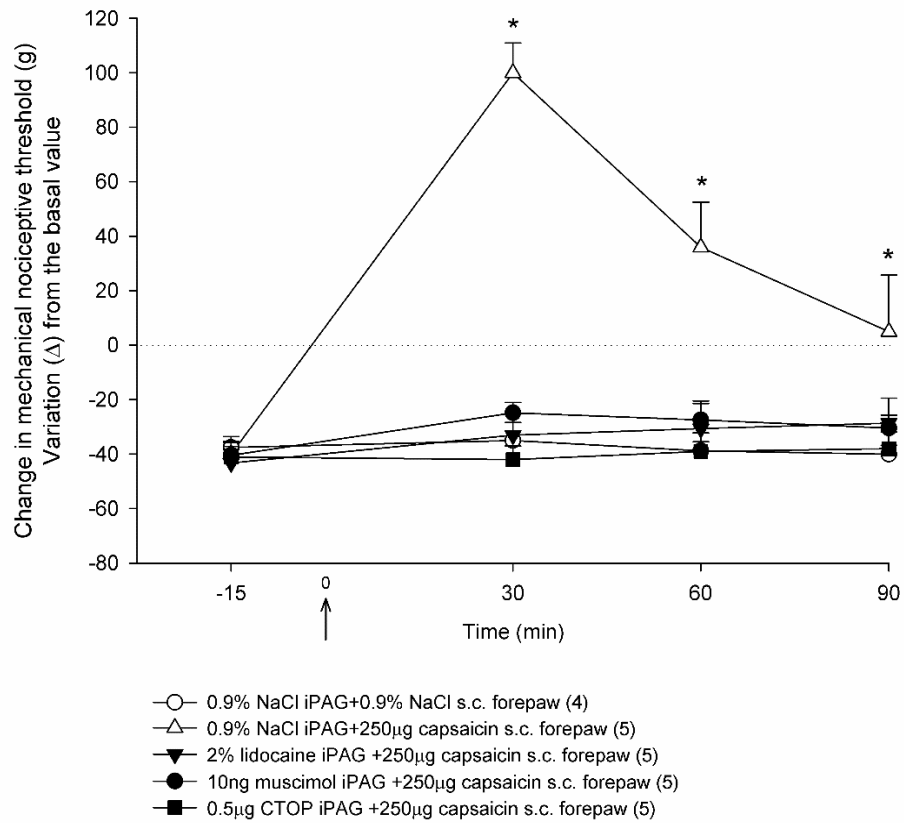
Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 C: $F_{\text{treatment}} (4,15) = 0.067$, $p = 0.991$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (12,45) = 1.069$, $p = 0.407$).

The antinociceptive effect mediated by the activation of ascending nociceptive control depends on PAG and RVM.

To evaluate the contribution of the PAG and RVM to the ascending nociceptive control-mediated antinociception, we used pharmacological approaches classically known to block the descending pain inhibitory system within either the PAG or the RVM level.

The blockade of PAG neural activity by the local administration of a quaternary derivative of lidocaine (QX-314) prevented capsaicin-induced antinociception ($p < 0.001$), showing that neural activity within the PAG is essential to such effect. The selective pharmacological blockade of μ -opioid receptors (by CTOP, $p < 0.001$), as well as activation of GABA_A receptors (by muscimol, $p < 0.001$) within the PAG prevented capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 3A: $F_{\text{treatment}} (4,19) = 12.219$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (12,57) = 24.295$, $p < 0.001$). By themselves, neither QX-314, nor CTOP or muscimol within the PAG change carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 D: $F_{\text{treatment}} (3,12) = 0.273$, $p = 0.844$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (9,36) = 0.926$, $p = 0.514$). Noteworthy, the administration of a μ -opioid receptor agonist (DAMGO) into the PAG of pain free animals (hindpaw injection of saline instead of carrageenan) induced an antinociceptive effect similar in magnitude and time-course to that induced by capsaicin (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S3: $F_{\text{treatment}} (2,14) = 3.563$, $p < 0.050$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (4,28) = 1.594$, $p = 0.204$). Since μ -opioid receptor agonists within the PAG are classically known to activate the descending inhibitory system, this finding demonstrates a strong similarity between the antinociceptive effect induced by capsaicin and by the descending system.

3A



3B

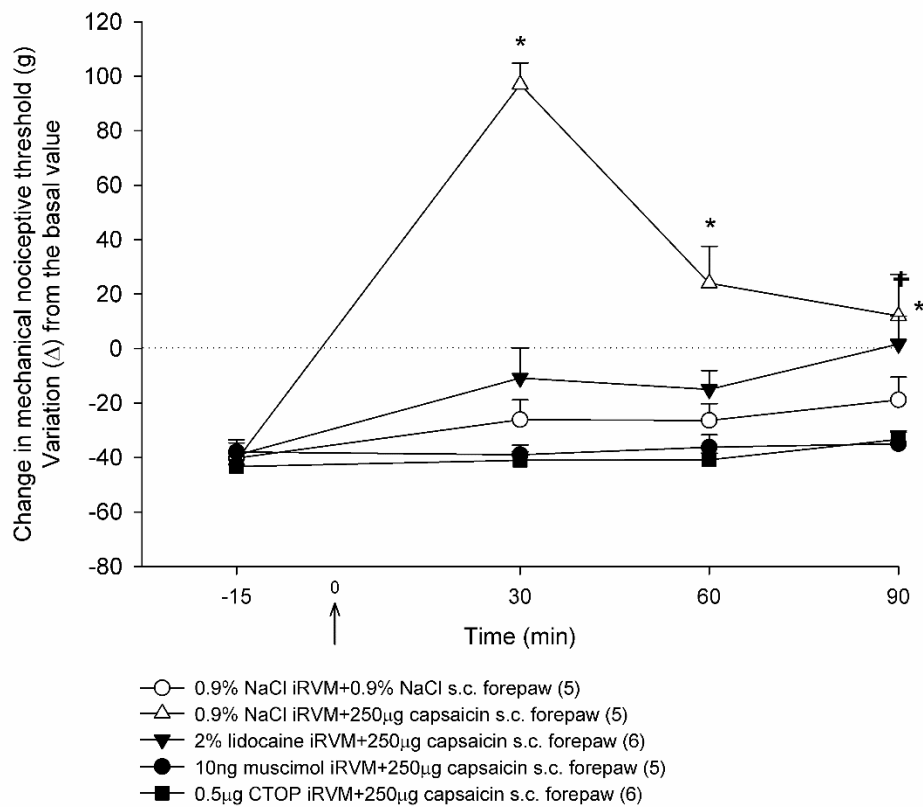


Figure 3. Capsaicin-induced antinociception on carrageenan-induced hyperalgesia depends on activation of μ -opioid receptors and inhibition of GABA_A receptors located on PAG and RVM. Capsaicin-induced antinociception in animals that have received the hindpaw injection of carrageenan (indicated by the symbol “**”) was prevented by the administration of QX-314 (a quaternary derivative of lidocaine); CTOP (μ -opioid receptor antagonist) or muscimol (GABA_A receptors agonist) either within the PAG (**A**) or the RVM (**B**) (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$). See Supplementary Figure S2 and results section for details regarding the effect of the drugs by themselves on carrageenan-induced hyperalgesia.

Consistently, the blockade of RVM neural activity by the local administration of QX-314 also prevented capsaicin-induced antinociception ($p < 0.001$), showing that neural activity within the RVM is essential to such effect. The selective pharmacological blockade of μ -opioid receptors ($p < 0.001$), as well as activation of GABA_A receptors ($p < 0.001$) within the RVM prevented capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 3B: $F_{\text{treatment}} (4,24) = 31.970$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (12,68) = 11.021$, $p < 0.001$). By themselves, neither QX-314, nor CTOP or muscimol within the RVM change carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 C: $F_{\text{treatment}} (4,15) = 0.067$, $p = 0.991$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (12,45) = 1.069$, $p = 0.407$). Since activation of μ -opioid receptors and inhibition of GABA_A receptors within the PAG and RVM are key mechanisms underlying inhibitory descending activity, these findings provide the first piece of evidence that the ascending nociceptive control-mediated analgesia depends on the descending pain modulation system.

The antinociceptive effect mediated by the activation of ascending nociceptive control depends on descending projections through the dorsolateral funiculus.

To evaluate whether descending projections through the DLF contribute to the ascending nociceptive control-mediated antinociception, we sectioned this funiculus at the thoracic level, a procedure known to abolish descending influences on spinal nociceptive transmission.

The DLF section prevented capsaicin-induced antinociception ($p < 0.001$), demonstrating that its integrity is essential to the ascending nociceptive control-mediated antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-

Keuls post hoc test; Figure 4A: $F_{\text{treatment}}(2,17) = 70.168$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(6,51) = 30.438$, $p < 0.001$). By itself, DLF section did not change carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 E: $F_{\text{treatment}}(5,19) = 0.557$, $p = 0.732$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(15,57) = 1.285$, $p = 0.242$). The extension of the lesion are shown in Figures 4B (sham lesion) and 4C (DLF lesion), and are limited to the determined region shown in Figure 4D.

Since descending pathways from PAG and RVM reach the dorsal horn to modulate nociceptive transmission by traveling through the DFL, this finding provides the second piece of evidence that the ascending nociceptive control-mediated analgesia depends on the descending pain modulation system.

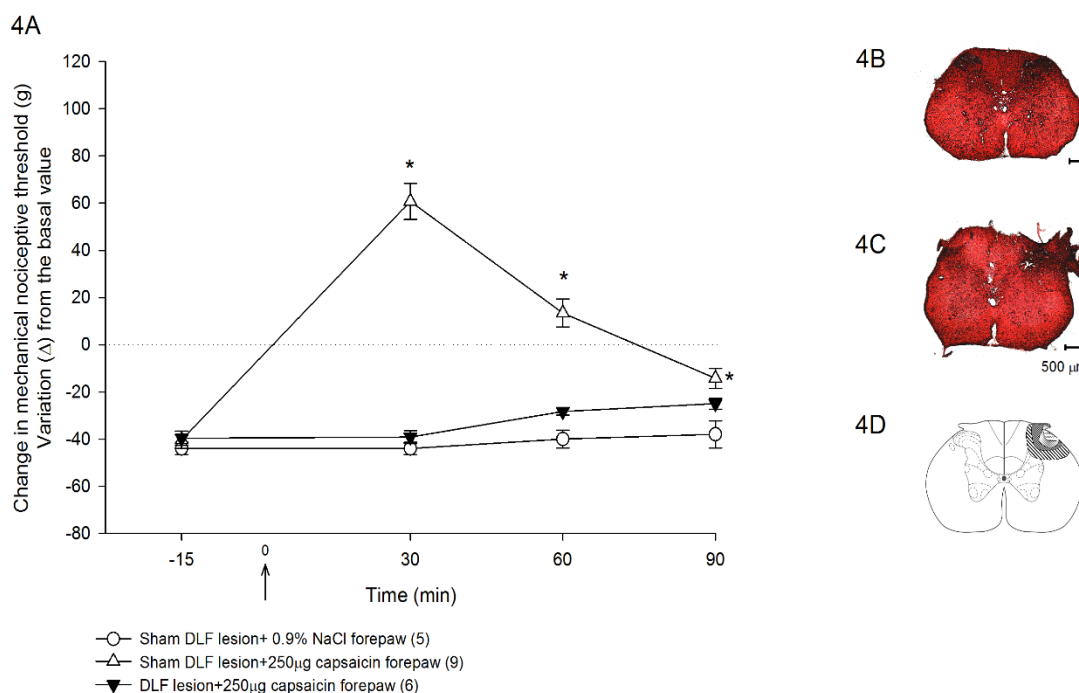


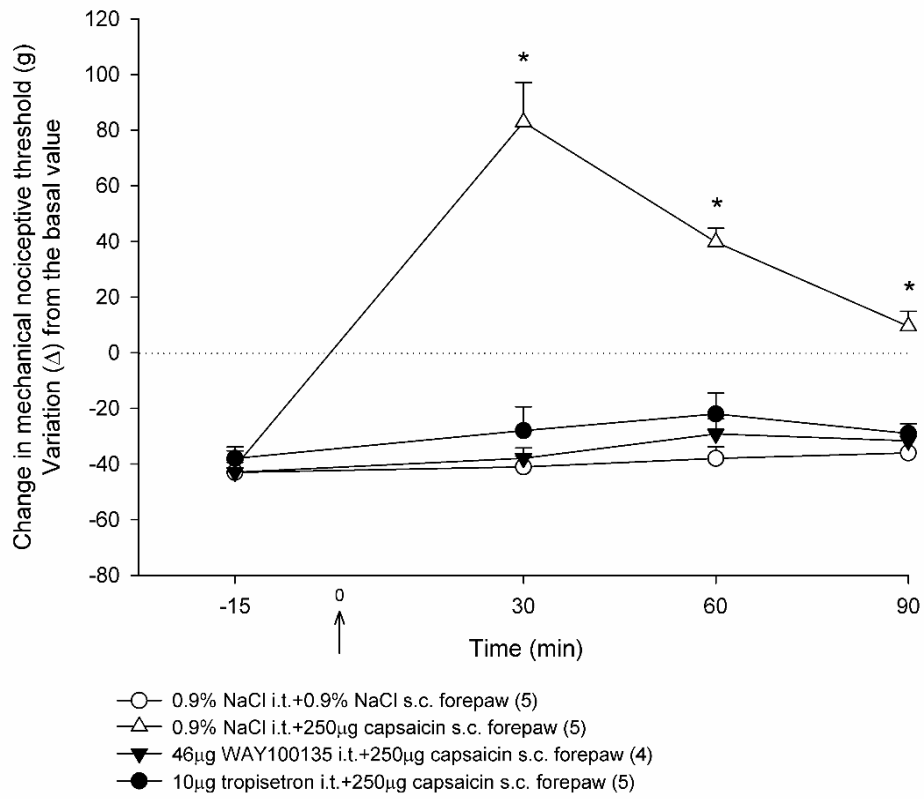
Figure 4. Capsaicin-induced antinociception on carrageenan-induced hyperalgesia depends on the integrity of the dorsolateral funiculus. (A) Capsaicin-induced antinociception in animals that have received the hindpaw injection of carrageenan (indicated by the symbol “*”) was prevented by the lesion of the DLF at thoracic level (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$). See Supplementary Figure S2 and results section for details regarding the effect of DLF lesion by itself on carrageenan-induced hyperalgesia. **(B)** Representative photographs from spinal cord sections (50 μm, neutral red) of the sham DLF-lesion and **(C)** DLF-lesion. **(D)** The extent of the DLF lesion is shown in the diagram adapted from the atlas of Paxinos and Watson. DLF = dorsolateral funiculus.

The antinociceptive effect mediated by the activation of ascending nociceptive control depends on spinal noradrenergic and serotonergic activity.

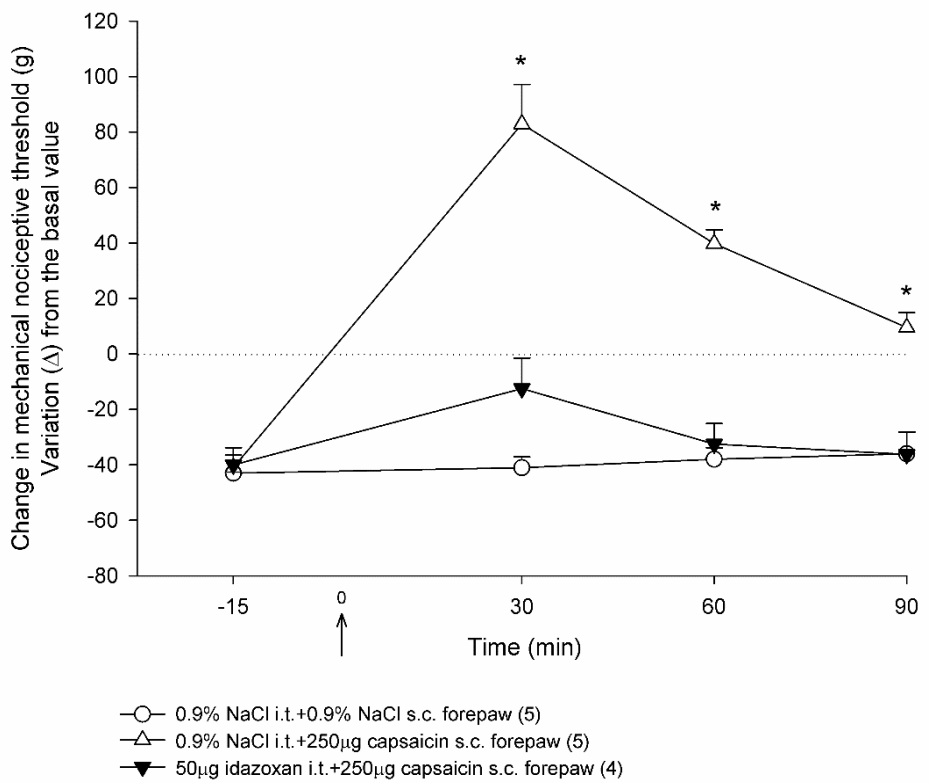
To evaluate whether spinal noradrenergic, serotonergic or dopaminergic activity contribute to the ascending nociceptive control-mediated antinociception, selective antagonists were spinally administered at doses known to block spinal pain modulation mechanisms.

The administration of either a serotonergic 5HT_{1A} receptor antagonist (WAY100135, $p < 0.001$) or a 5HT₃ receptor antagonist (tropisetron, $p < 0.001$) prevented capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 5A: $F_{\text{treatment}} (3,17) = 45.833$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (9,51) = 13.218$, $p < 0.001$). Similarly, the administration of a selective α_2 -adrenoceptor antagonist (idazoxan, $p < 0.001$) also prevented capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 5B: $F_{\text{treatment}} (2,13) = 60.755$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (6,39) = 10.871$, $p < 0.001$). In contrast, the administration of a selective dopamine D2-like receptor antagonist did not significantly affect capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 5C: $F_{\text{treatment}} (3,19) = 24.652$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (9,57) = 10.089$, $p < 0.001$). By themselves, none of the antagonists changed carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 E: $F_{\text{treatment}} (5,19) = 0.557$, $p = 0.732$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (15,57) = 1.285$, $p = 0.242$). Since the descending pathways involved in pain modulation are mostly serotonergic and noradrenergic, these findings provide the third piece of evidence that the ascending nociceptive control-mediated analgesia depends on the descending pain modulation system.

5A



5B



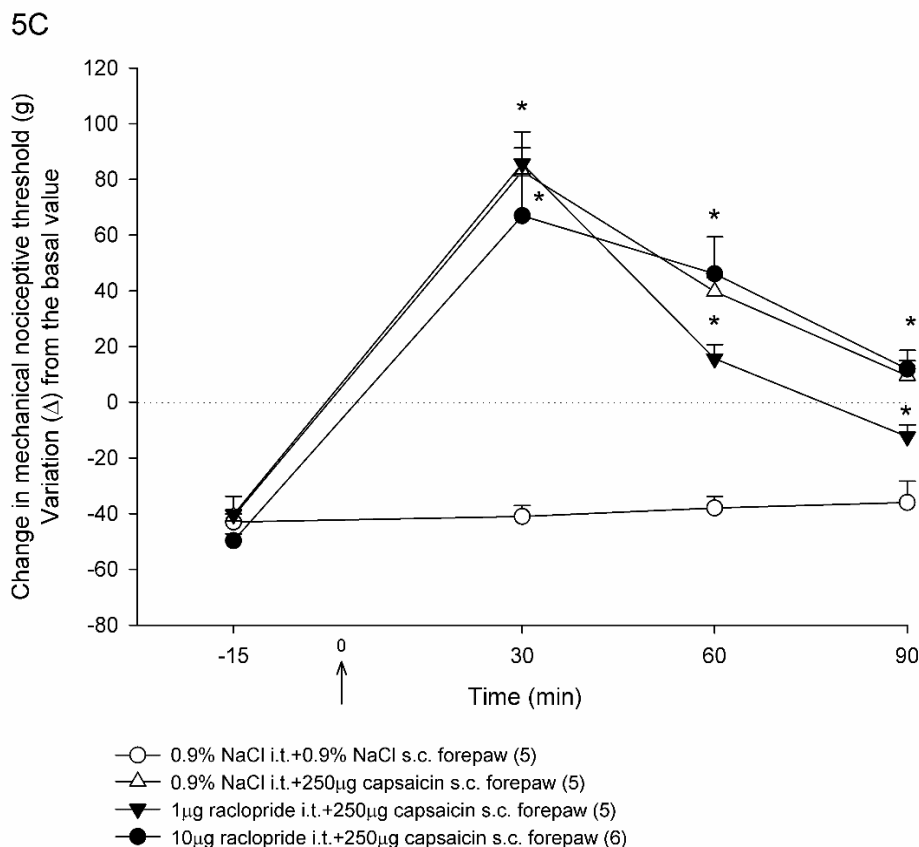


Figure 5. Capsaicin-induced antinociception on carrageenan-induced hyperalgesia depends on spinal serotonergic and adrenergic but not dopamine receptors. (A) Capsaicin-induced antinociception in animals that have received the hindpaw injection of carrageenan (indicated by the symbol “*”) was prevented by the intrathecal administration of WAY100135 (a 5HT_{1A} serotonin receptor antagonist); tropisetron (a 5HT₃ serotonin receptor antagonist) or (B) idazoxan (a α 2 adrenergic receptor antagonist) but not that of (C) raclopride (a D2 dopamine receptor antagonist) (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$). See Supplementary Figure S2 and results section for details regarding the effect of the antagonists by themselves on carrageenan-induced hyperalgesia. The groups 0.9% NaCl i.t.+0.9% NaCl s.c. forepaw and 0.9% NaCl i.t.+250µg capsaicin s.c. forepaw in figures B e C were replotted from Figure A.

c-Fos expression in NAc, PAG and RVM.

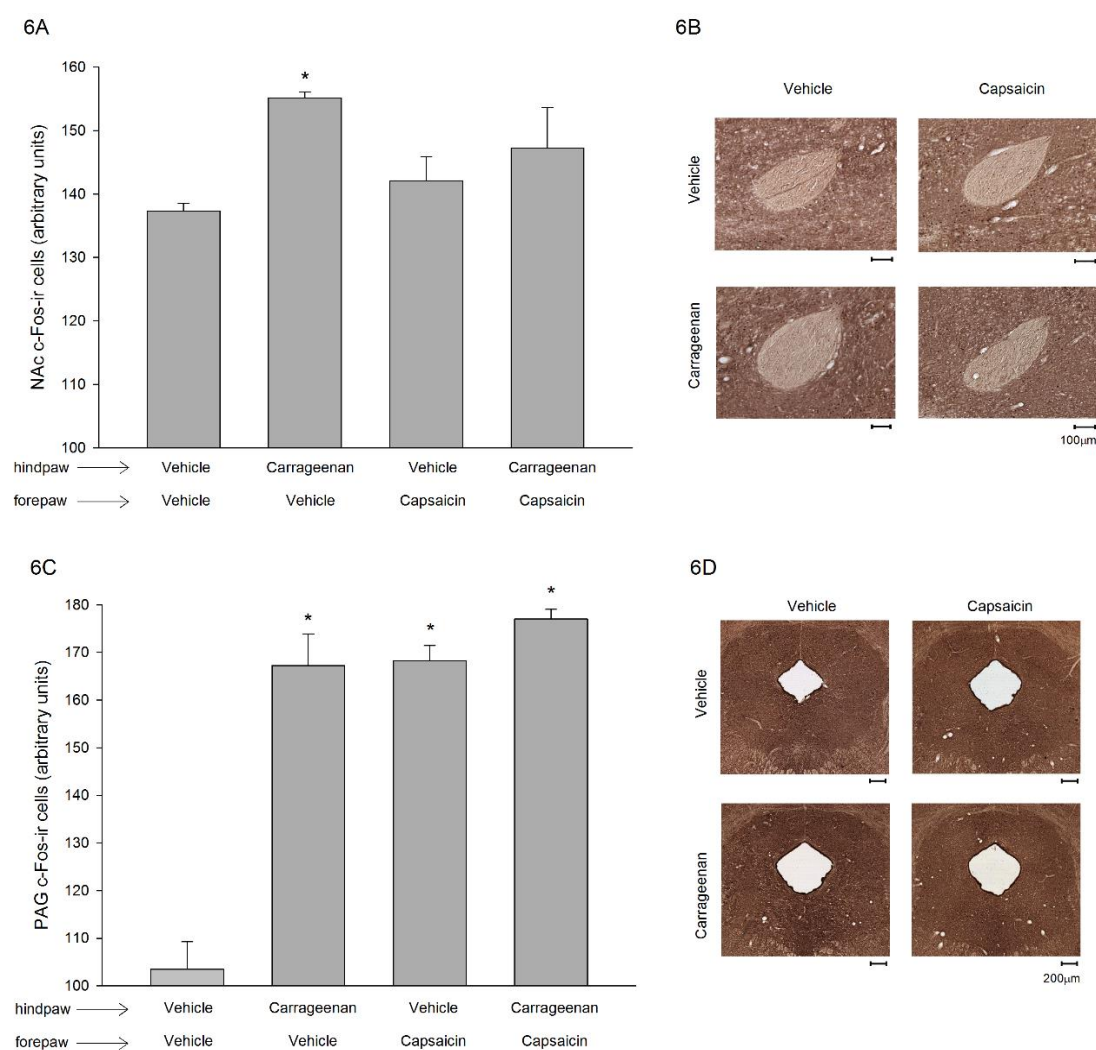
To indirectly estimate neural activity within the NAc, PAG and RVM we quantified local c-Fos protein expression, which rapidly and transiently increases in response to neuronal firing.

Within the NAc, c-Fos expression significantly increased with the hindpaw injection of carrageenan ($p = 0.006$), an effect prevented by the forepaw injection of capsaicin ($p = 0.168$). The forepaw injection of capsaicin ($p = 0.393$) by itself had no effect (two-way ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test Figure 6A: $F_{\text{hindpaw} \times \text{forepaw}} (1,12) = 2.774$, $p = 0.122$).

Within the PAG, c-Fos expression significantly increased with the injection of either carrageenan ($p < 0.001$) or capsaicin ($p < 0.001$) and carrageenan plus capsaicin ($p < 0.001$) (two-way ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test Figure 6C: $F_{\text{hindpaw} \times \text{forepaw}} (1,12) = 28.230, p < 0.001$).

Within the RVM, a non-significant tendency of c-Fos expression to increase with the different treatments was detected (two-way ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test Figure 6D: $F_{\text{hindpaw} \times \text{forepaw}} (1,12) = 2.373, p = 0.149$).

Representative photomicrographs of c-Fos-ir cells within the NAc, PAG and RVM are shown in figures 6B, 6D and 6F respectively.



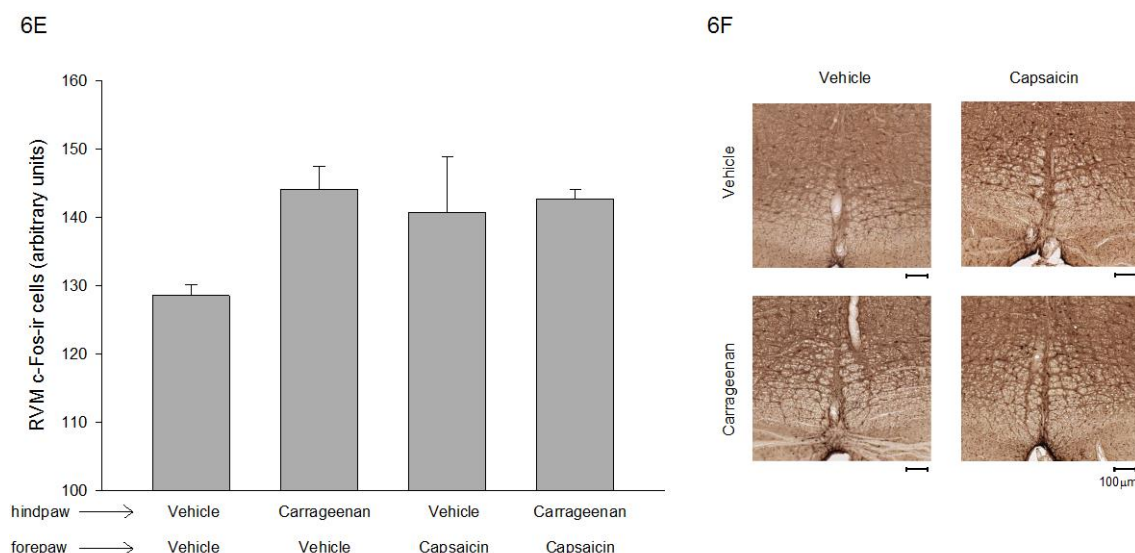
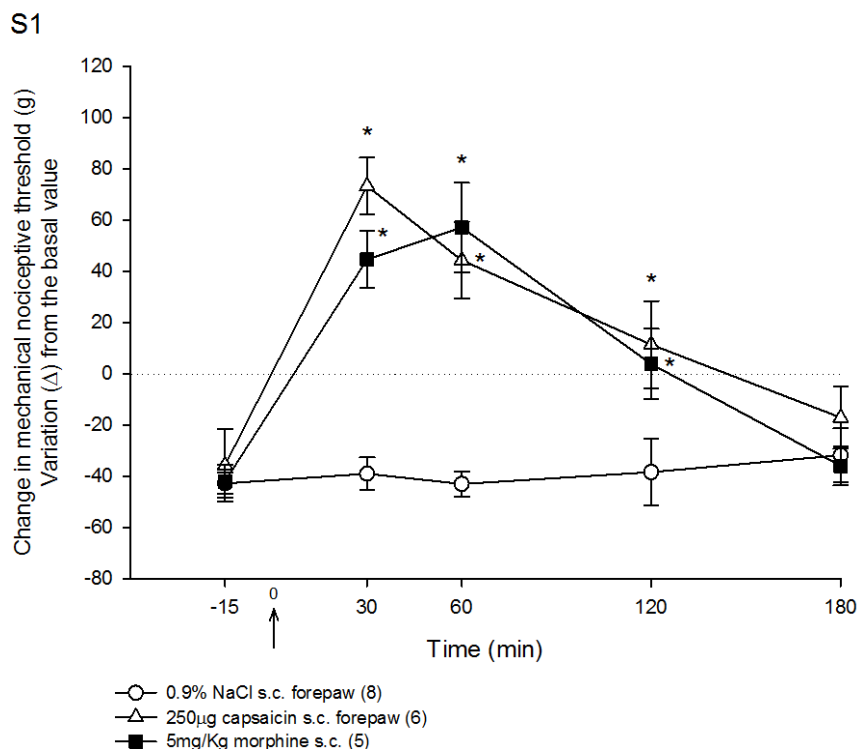


Figure 6. c-Fos expression in the NAc, PAG and RVM. (A) The hindpaw injection of carrageenan significantly increased c-Fos-immunoreactive (c-Fos-ir) optical density within the NAc (indicated by the symbol “*”); the forepaw injection of capsaicin reversed this effect and did not affect c-Fos-ir optical density by itself. (C) All three experimental interventions significantly increased c-Fos-ir optical density within the PAG (E) c-Fos-ir optical density within the RVM was not significantly changed (two-way ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$). The brains were collected 30 minutes after forepaw injection. Representative photomicrographs of c-Fos-ir cells (10x magnification) within the (B) NAc, (D) PAG and (F) RVM. Scale bar are represented in the figures.

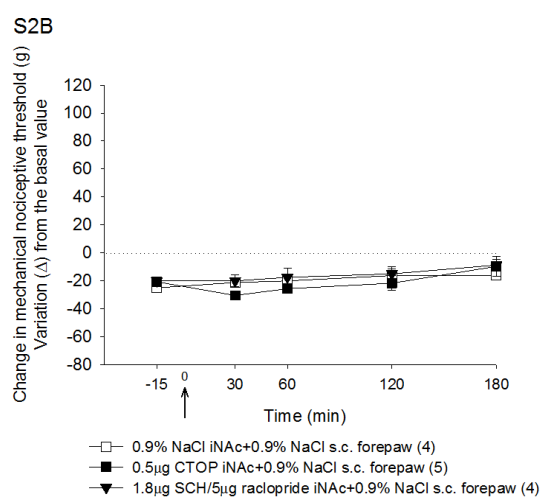
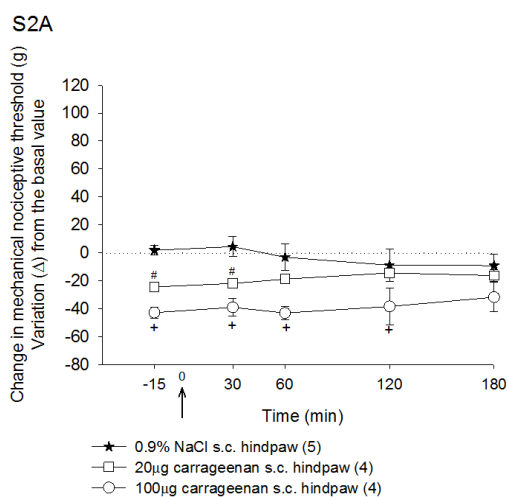
Locomotor activity

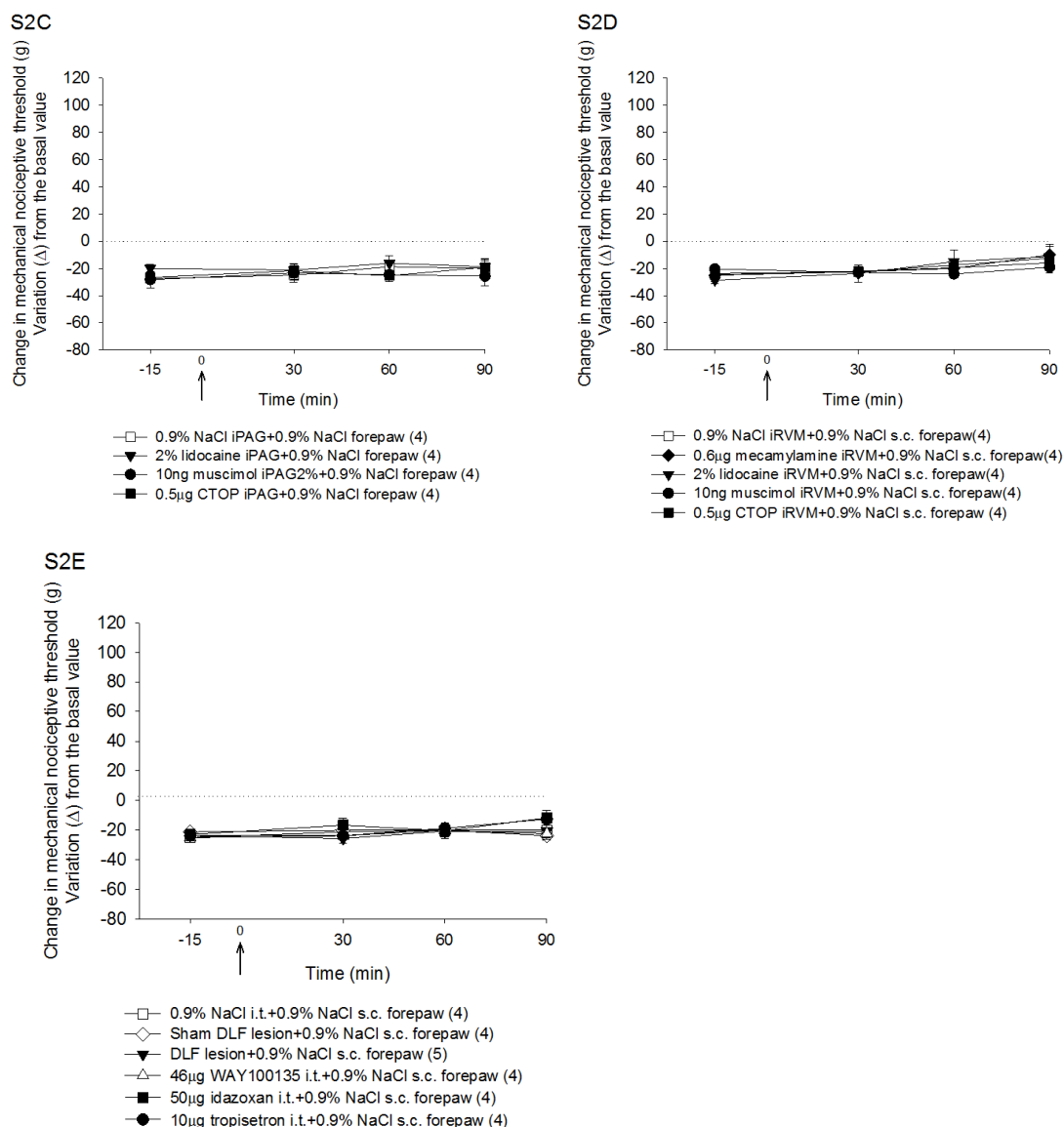
Locomotion in the open field test did not significantly change with different treatments and experimental manipulations (Supplementary Table S1).

The anatomical reconstruction of the injection sites into the NAc core; ventrolateral PAG; RVM and off sites is shown in supplementary material (Supplementary Figure S4).



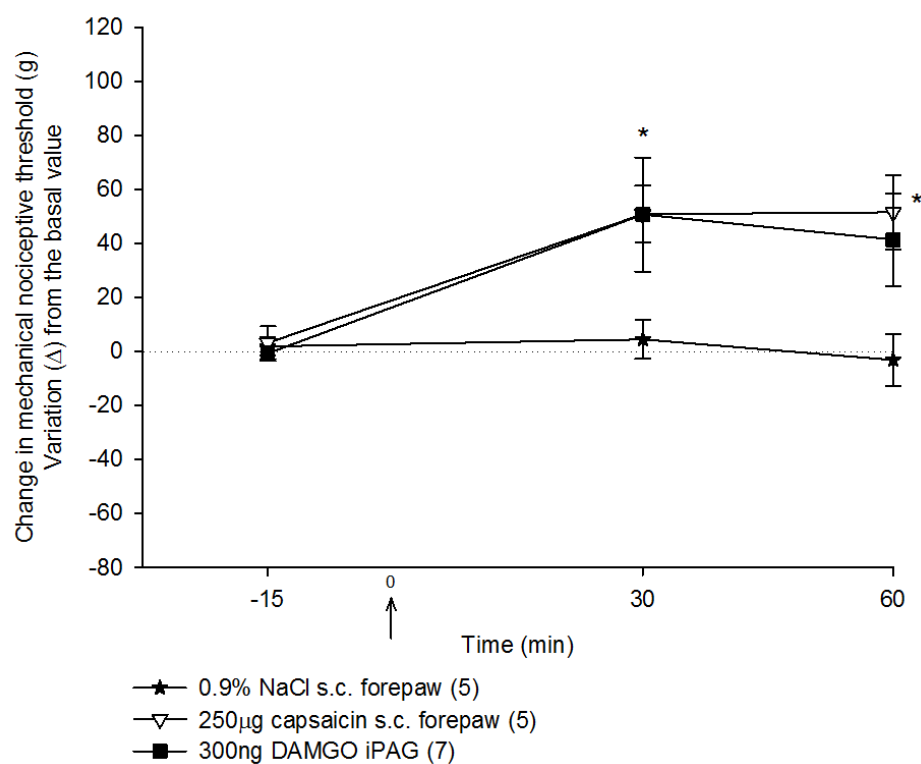
Supplementary Figure S1. Capsaicin-induced antinociception is similar to systemic morphine-induced antinociception. The forepaw injection of capsaicin or the systemic morphine administration significantly increased (indicated by the symbol “**”) mechanical nociceptive threshold in animals that have received carrageenan into the hindpaw (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$). The groups 100 μ g carrageenan s.c. hindpaw+0.9% NaCl s.c. forepaw and 100 μ g carrageenan s.c. hindpaw +250 μ g capsaicin s.c. forepaw were replotted from Figure 2A.



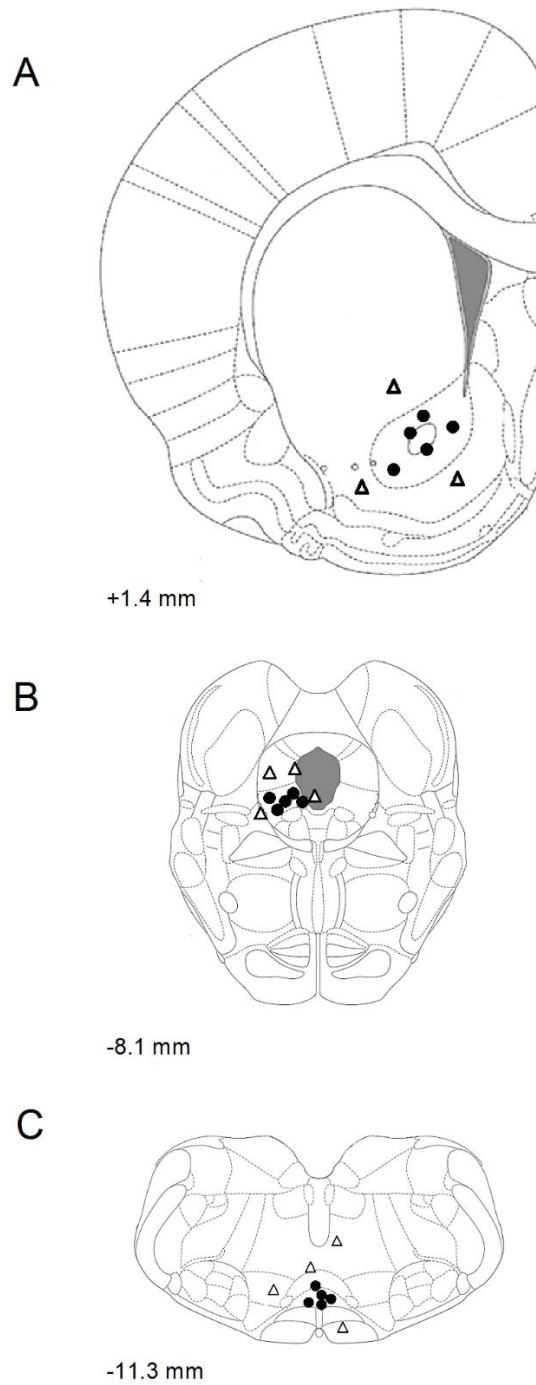


Supplementary Figure S2. Control groups – by themselves the experimental manipulations did not affect carrageenan-induced hyperalgesia. (A) The hindpaw injection of carrageenan dose dependently decreased the mechanical nociceptive threshold. Carrageenan at 20 μ g induced an intermediate response which facilitates the observation of any tendency of drugs to further decrease (or increase) mechanical nociceptive threshold (the symbol “#” indicates mechanical nociceptive threshold significantly different from the other groups; the symbol “+” indicates a significant decrease in mechanical nociceptive threshold compared with the saline group,). The administration of the drugs used in this study within the **(B)** NAc (nucleus accumbens), **(C)** PAG (periaqueductal gray), **(D)** RVM (rostral ventromedial medulla) or **(E)** spinal cord (including DLF lesion) did not affect carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$).

S3



Supplementary Figure S3. Capsaicin-induced antinociception is similar to intra-PAG DAMGO-induced antinociception. The forepaw injection of capsaicin or the intra-PAG administration of DAMGO (a μ -opioid receptor agonist) significantly increased (indicated by the symbol “*”) mechanical nociceptive threshold in animals that have received saline into the hindpaw (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$). The groups 0.9% NaCl s.c. hindpaw+0.9% NaCl s.c. forepaw and 0.9% NaCl s.c. hindpaw+250 μ g capsaicin s.c. forepaw were replotted from Figure 2A.



Supplementary Figure S4. Microinjection sites. (A) Reconstruction adapted from the atlas of Paxinos and Watson showing microinjections within the NAc core, (B) ventrolateral PAG and (C) RVM. Some symbols overlap others and represent injection sites in two representative groups: “•” on-site injections (animals included in the study); “Δ” off-site injections (animals excluded from the study). Numbers represent distance caudal to bregma in millimeters.

Injection site	Group	Mean	SEM	F	p
N/A	Vehicle+vehicle	24.80	3.43	1.184	0.341
	100µg carrageenan+vehicle	18.71	2.14		
	100µg carrageenan+250µg capsaicin	16.38	2.21		
	Vehicle+250µg capsaicin	19.60	1.69		
	100µg carrageenan+5mg/Kg morphine	22.20	5.75		
NAc	Vehicle+100µg carrageenan+vehicle	25.83	3.35	2.253	0.078
	Vehicle+100µg carrageenan+250µg capsaicin	18.00	2.47		
	0.5µg CTOP+100µg carrageenan+250µg capsaicin	16.33	3.13		
	1.8µg SCH23390+100µg carrageenan+250µg capsaicin	20.00	2.87		
	5µg raclopride+100µg carrageenan+250µg capsaicin	29.00	7.31		
	1.8µg SCH23390/5µg raclopride+100µg carrageenan+250µg capsaicin	11.75	1.19		
PAG	Vehicle+100µg carrageenan+vehicle	19.00	2.04	2.688	0.065
	Vehicle+100µg carrageenan+250µg capsaicin	20.50	1.32		
	2% lidocaine+100µg carrageenan+250µg capsaicin	10.40	2.29		
	0.5µg CTOP+100µg carrageenan+250µg capsaicin	17.40	1.47		
	10ng muscimol+100µg carrageenan+250µg capsaicin	22.20	4.80		
RVM	Vehicle+100µg carrageenan+vehicle	17.25	3.59	1.697	0.167
	Vehicle+100µg carrageenan+250µg capsaicin	20.63	2.07		
	0.6µg mecamylamine+100µg carrageenan+250µg capsaicin	25.40	3.83		
	2% lidocaine+100µg carrageenan+250µg capsaicin	13.43	3.48		
	10ng muscimol+100µg carrageenan+250µg capsaicin	17.00	2.63		
	0.5µg CTOP+100µg carrageenan+250µg capsaicin	14.00	4.62		
Spinal cord	Vehicle+100µg carrageenan+vehicle	19.00	2.24	1.226	0.308
	Vehicle+100µg carrageenan+250µg capsaicin	23.80	3.97		
	46µg way100.135+100µg carrageenan+250µg capsaicin	18.50	2.53		
	10µg tropisetron+100µg carrageenan+250µg capsaicin	14.40	3.61		
	50µg idazoxan+100µg carrageenan+250µg capsaicin	15.25	3.45		
	1µg raclopride+100µg carrageenan+250µg capsaicin	21.80	2.94		
	10µg raclopride+100µg carrageenan+250µg capsaicin	15.17	3.65		
	Sham DLF lesion+100µg carrageenan+vehicle	16.75	1.60		
	Sham DLF lesion+100µg carrageenan+250µg capsaicin	14.00	2.07		
	DLF lesion+100µg carrageenan+250µg capsaicin	19.00	2.39		

Supplementary Table 1. Effect (mean \pm S.E.M.) of experimental manipulations on locomotor activity in the open field test. None of the treatments significantly affected locomotion ($p > 0.05$, one-way ANOVA). N/A = not applicable; vehicle = 0.9% NaCl; NAc = nucleus accumbens; PAG = periaqueductal gray; RVM = rostral ventromedial medulla; DLF = dorsolateral funiculus.

Discussion

This study describes an ascending-descending pain modulation pathway triggered by pain and dependent on the NAc and on the PAG-RVM descending system. The ascending component, named ascending nociceptive control is triggered by noxious stimulation and induces potent and long lasting remote antinociception dependent on opioidergic and dopaminergic mechanisms within the NAc (Gear et al., 1999; Schmidt et al., 2002a). The descending component is the most powerful known pain modulation mechanism, the PAG-RVM descending system (Fields, 2004; Millan, 2002). The functional link between the two components was demonstrated using a pharmacological approach, in which the antinociception induced by noxious stimulation was prevented either by all the already known supraspinal interventions that block the ascending component or by standard interventions known to block the descending one. To our knowledge, this is the first description of a spinal-forebrain-midbrain-spinal pathway for pain modulation.

The mechanisms underlying the antinociception induced by noxious stimulation in this study differ from other forms of pain-induced analgesia, such as Diffuse Noxious Inhibitory Control (DNIC) or Conditioned Pain Modulation (CPM), the most used terms in animal and human studies, respectively (Nir & Yarnitsky, 2015). DNIC-like effects are characteristically short-term and dependent on the maintenance of the noxious stimulation, disappearing soon after it has ceased (for review see (Pud et al., 2009)). In contrast, ascending nociceptive control-mediated analgesia lasts more than an hour and once initiated it becomes independent on the eliciting stimulus (Tambeli et al., 2009). In addition, DNIC-like effects are mediated by mechanisms restricted to the lower brainstem (Le Bars, 2002; Ossipov et al., 2010). Therefore, the ascending nociceptive control is the only known form of pain-induced analgesia dependent on forebrain mechanisms (Gear et al., 1999).

In fact, ascending nociceptive control-mediated analgesia has been shown to be dependent on opioidergic and dopaminergic mesolimbic mechanisms within the NAc (Gear et al., 1999; Schmidt et al., 2002a). This was further demonstrated in the present study, since capsaicin-induced antinociception was prevented by the intra-accumbal administration of either a μ -opioid receptor antagonist (Figure 2B) or a combination of dopamine D1 and D2 receptor antagonists (Figure 2C). When administered alone, each dopaminergic antagonist induced an intermediate effect, suggesting that endogenous dopamine act on both D1 and D2 receptors to induce

antinociception. This data extends previous findings that have demonstrated the ability of a non-selective dopamine receptor antagonist to prevent ascending nociceptive control-mediated antinociception (Gear et al., 1999). Subsequent attempts to identify additional supraspinal nuclei involved in ascending nociceptive control-mediated analgesia have identified a cholinergic nicotinic mechanism within the RVM (Gear & Levine, 2009). This was confirmed by our finding that capsaicin-induced antinociception was prevented by the intra-RVM administration of a nicotinic receptor antagonist (Figure 2D).

The involvement of the PAG-RVM descending system in ascending nociceptive control-mediated antinociception has been already investigated and ruled out, since the administration of naloxone either within the PAG or the RVM did not affect antinociception (Gear et al., 1999; Gear & Levine, 1995). These findings were interpreted as evidence that both system are independent because opioid mechanisms within the PAG and the RVM are the neural basis of the descending system (Fields, 2004). However, in this study we have revisited this interpretation providing a bundle of data to argue that both systems are functionally linked. The initial evidence is that neuronal inactivation of either the PAG (Figure 3A) or the RVM (Figure 3B) by the local injection of lidocaine prevented capsaicin-induced antinociception. These findings demonstrate that both the PAG and the RVM are essential to the ascending nociceptive control-mediated antinociception. In addition, the blockade of μ -opioid receptors, as well as the activation of GABA_A receptors within either the PAG (Figure 3A) or the RVM (Figure 3B) prevented capsaicin-induced antinociception. These procedures block descending inhibitory activity (Lane et al., 2005; Lau & Vaughan, 2014; Vaughan et al., 1997; Yaksh et al., 1976) because neurons responsible by its control are under tonic GABAergic inhibition that can be suppressed by μ -opioid mechanisms (Fields, 2004; Millan, 2002). Therefore, the blockade of mechanisms of descending inhibition within either the PAG or the RVM blocks ascending nociceptive control-mediated antinociception. In the next step we have shown that either the DLF lesion (Figure 4A) or the spinal administration of serotonergic (5HT_{1A} and 5HT₃, Figure 5A) or noradrenergic (α 2, Figure 5B) but not dopaminergic (D2, Figure 5C) receptor antagonists prevented capsaicin-induced antinociception. These strategies were used because the descending pathways reach the dorsal horn via the DLF (Millan, 2002) and release serotonin and

norepinephrine. In contrast, dopaminergic descending projections originate mainly in the hypothalamic A11 region (Millan, 2002), which explains the lack of effect of the dopamine antagonist. Therefore, once again, but now at the spinal level, procedures classically known to block the antinociception mediated by the descending system, also block that mediated by the ascending nociceptive control.

The inability of naloxone administered into the PAG or RVM to block ascending nociceptive control-mediated antinociception in previous studies (Gear et al., 1999; Gear & Levine, 1995) may result from its non-selectivity. Naloxone could eventually block κ -, in addition to μ -opioid receptor mediated effects, this may be critical since opposite effects on nociception have been attributed to each receptor subtype expressed within these regions (Meng et al., 2005). In fact, selective μ -opioid receptor antagonists are more effective than equipotent doses of non-selective antagonists in blocking the antinociceptive effects mediated by the descending system (Budai & Fields, 1998; Kiefel et al., 1993).

Neuronal activity indirectly estimated by c-Fos expression within the NAc, PAG and RVM supports behavioral observations. Within the NAc, c-Fos expression increased with carrageenan-induced hyperalgesia, an effect not observed when capsaicin was injected in the forepaw of animals receiving either carrageenan or vehicle into the hindpaw (Figure 6A). Since NAc activity is pronociceptive and analgesia mediated by the ascending nociceptive control depends on its inhibition (Gear & Levine, 2011), increased c-Fos expression with carrageenan may reflect increased NAc activity during hyperalgesia. Complementarily, the decrease in c-Fos expression with capsaicin may reflect inhibition of NAc to induce antinociception. Within the PAG, c-Fos expression significantly increased in response to peripheral stimulation, no matter if it was with carrageenan, capsaicin or both together (Figure 6C). The same effect was observed within the RVM (Figure 6E), but failed significance. This may reflect increased PAG and RVM activity during either inflammatory hyperalgesia or endogenous analgesia, something expected considering their role on pain processing and modulation. In fact, previous studies have demonstrated increased c-Fos expression within the PAG and the RVM in response to either nociceptive activity (Han et al., 2003; Keay & Bandler, 1993) or endogenous analgesia (Loyd et al., 2007).

Nucleus accumbens is the critical target of the dopaminergic mesolimbic system which, along with its well-known role in reward and motivation (Berridge &

Kringelbach, 2015), has been shown to have an important role in pain modulation (for excellent reviews see (Baliki & Apkarian, 2015; Navratilova et al., 2015)). However, in the current literature panorama, the mesolimbic and the descending system appear to modulate pain through totally independent mechanisms, to such an extent that important revisions in each system, barely mention the other one (Baliki & Apkarian, 2015; De Felice & Ossipov, 2016). In fact, although the PAG is anatomically connected with the ventral tegmental area and the NAc (Kirouac et al., 2004; Suckow et al., 2013) and evidences dating from the early 1990s suggest a bidirectional opioid loop between them (Ma & Han, 1991; Ma et al., 1992; Yu & Han, 1990), to our knowledge this is the first evidence linking the descending and mesolimbic systems in an endogenous pain modulation mechanism. Recently Baliki and Apkarian have proposed that acute pain experience depends on peripheral nociceptive drive and on a threshold phenomenon, responsible to determine when nociception turns to pain perception (Baliki & Apkarian, 2015). This nociception-pain threshold is supposed to be dependent on mesolimbic activity, however the underlying mechanistic basis is unclear. The findings from the present study fit well as a possible mechanism in this scenario, because the descending system has a powerful ability to decrease nociceptive transmission, which consequently increases the pain perception threshold. Evidently, further studies are needed to support this idea as well as to determine whether the mesolimbic system connects with the descending system through cortical or subcortical circuitry.

Although previous human brain image studies have indirectly correlated PAG activity with analgesia in response to some kinds of noxious stimulation (Derbyshire & Osborn, 2009; Sprenger et al., 2011; Yelle et al., 2009), to our knowledge this is the first functional evidence showing that the PAG-RVM descending system mediates pain-induced analgesia. During threatening situations, pain modulation mechanisms are activate in a preventive way, ensuring that the subject will be free for engaging in defensive responses. But if intense noxious stimulation takes place, additional mechanisms may be necessary to suppress pain perception and the ascending nociceptive control may be recruited to perform this task. We propose that the ascending nociceptive control enhances the activation of the descending system, ensuring that the most potent pain modulation mechanism will work in an optimal way when most necessary, during threatening situations accompanied by intense acute pain.

In summary, this study demonstrates that noxious stimulation triggers an ascending-descending pain modulation pathway linking the mesolimbic system to the PAG-RVM descending system. The mesolimbic system is believed to codify the value, salience and expectation related to pain experience (Baliki & Apkarian, 2015; Porreca & Navratilova, 2017) and to select the most advantageous behavioral action. Pain perception can disturb the expression of the selected behavioral action. An excellent way to prevent this from happening is to increase the pain perception threshold by activating the most powerful pain modulation system. The present study presents a possible mechanism to achieve this goal and adds important pieces to the endogenous pain modulation puzzle. The understanding of the endogenous pain modulation mechanisms has proved to be of great value for the development of new strategies for pain control (Ossipov et al., 2010). This study contributes to advance our understanding in this fascinating field.

Acknowledgments

This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) and Funding Authority for Studies and Projects (FINEP, Brazil). G.T. and N.F.S. were recipient of PhD fellowships from CAPES. The authors declare that there is no conflict of interests.

7 DISCUSSÃO

Este estudo descreve uma via de modulação da dor ascendente-descendente ativada por dor e que é dependente do NAc e do sistema descendente PAG-RVM. O componente ascendente, denominado controle nociceptivo ascendente, é ativado por estimulação nociceptiva e induz potente e duradoura antinocicepção heterosegmental a qual é dependente de mecanismos opioidérgicos e dopaminérgicos no NAc (Gear et al., 1999; Schmidt et al., 2002a). O componente descendente é o mecanismo mais poderoso de modulação da dor conhecido, o sistema descendente PAG-RVM (Fields, 2004; Millan, 2002). A ligação funcional entre os dois componentes foi demonstrada através de uma abordagem farmacológica, na qual a antinocicepção induzida por estimulação nociceptiva foi prevenida por todas as intervenções supraespinhais já conhecidas que bloqueiam o componente ascendente ou por intervenções padrões conhecidas por bloquear o descendente. Ao nosso conhecimento, esta é a primeira descrição de uma via espinhal-prosencéfalo-mesencéfalo-espinhal envolvida na modulação da dor.

O controle nociceptivo ascendente é a única forma conhecida de analgesia induzida pela dor dependente de mecanismos na região anterior do cérebro (prosencéfalo) (Gear et al., 1999). De fato, a analgesia mediada pelo controle nociceptivo ascendente mostrou-se dependente de mecanismos mesolímbicos opioidérgicos e dopaminérgicos no NAc (Gear et al., 1999; Schmidt et al., 2002a). Isto foi demonstrado no presente estudo, uma vez que a antinocicepção induzida por capsaicina foi prevenida pela administração intra-NAc de antagonista do receptor μ -opioide (Figure 2B) ou pela combinação de antagonistas dos receptores D₁ e D₂ de dopamina (Figure 2C). Quando administrado sozinho, cada antagonista dopaminérgico induziu um efeito intermediário, sugerindo que a dopamina endógena atua nos receptores D₁ e D₂ para induzir antinocicepção. Estes dados estendem as descobertas anteriores que demonstraram a capacidade de um antagonista não seletivo de receptor de dopamina em prevenir a antinocicepção mediada pelo controle nociceptivo ascendente (Gear et al., 1999).

As tentativas subsequentes de identificar núcleos supraespinhais adicionais envolvidos na analgesia mediada pelo controle nociceptivo ascendente identificaram um mecanismo nicotínico colinérgico no RVM (Gear & Levine, 2009). Isto foi

confirmado pelos nossos dados de que a antinocicepção induzida por capsaicina foi prevenida pela administração intra-RVM de um antagonista do receptor nicotínico (Figure 2D).

O envolvimento do sistema descendente PAG-RVM na antinocicepção mediada pelo controle nociceptivo ascendente já foi investigado anteriormente e descartado, uma vez que a administração de naloxona na PAG ou no RVM não afetou a antinocicepção (Gear et al., 1999; Gear & Levine, 1995). Esses achados foram interpretados como evidências de que ambos os sistemas são independentes porque os mecanismos opioides intra-PAG e -RVM são a base neural do sistema descendente (Fields, 2004). No entanto, neste estudo revisamos essa interpretação fornecendo dados substanciais para argumentar que ambos os sistemas estão funcionalmente vinculados. A evidência inicial é que a inativação neuronal da PAG (Figure 3A) ou do RVM (Figure 3B) pela injeção local de lidocaína impediu a antinocicepção induzida por capsaicina. Esses achados demonstram que tanto a PAG como o RVM são essenciais para a antinocicepção mediada pelo controle nociceptivo ascendente. Além disso, o bloqueio dos receptores μ -opioide, bem como a ativação dos receptores GABA_A intra-PAG (Figure 3A) ou -RVM (Figure 3B) impediram a antinocicepção induzida por capsaicina. Estes procedimentos bloqueiam a atividade descendente inibitória (Lane et al., 2005; Lau & Vaughan, 2014; Vaughan et al., 1997; Yaksh et al., 1976) porque os neurônios responsáveis pelo seu controle estão sob tônica inibição GABAérgica que pode ser suprimida pelos mecanismos μ -opioide (Fields, 2004; Millan, 2002). Portanto, o bloqueio de mecanismos descendentes inibitórios intra-PAG ou intra-RVM bloqueia a antinocicepção mediada pelo controle nociceptivo ascendente.

No próximo passo, mostramos que a lesão do DLF (Figure 4A) ou a administração espinal de antagonistas de receptores serotoninérgicos (5HT_{1A} e 5HT₃, Figure 5A) ou adrenérgicos (α 2, Figure 5B) mas não dopaminérgicos (D₂, Figure 5C) impediram a antinocicepção induzida pela injeção de capsaicina. Essas estratégias foram usadas porque as vias descendentes atingem o corno dorsal através do DLF (Millan, 2002) e liberam serotonina e noradrenalina. Em contrapartida, as projeções descendentes dopaminérgicas se originam principalmente na região A11 do hipotálamo (Millan, 2002), não sendo um mecanismo clássico descendente, o que explica a falta de efeito pelo antagonista da dopamina. Portanto, mais uma vez, mas

agora ao nível da medula espinhal, os procedimentos classicamente conhecidos por bloquear a antinocicepção mediada pelo sistema descendente, também bloqueiam a mediada pelo controle nociceptivo ascendente.

A incapacidade da naloxona administrada intra-PAG ou -RVM em bloquear a antinocicepção mediada pelo controle nociceptivo ascendente em estudos anteriores (Gear et al., 1999; Gear & Levine, 1995) pode ser resultado de sua não seletividade. A naloxona pode, eventualmente, bloquear receptores do tipo κ -, além dos efeitos mediados por receptores μ -opioide, isso pode ser crítico, uma vez que efeitos opostos na nocicepção foram atribuídos a estes subtipos de receptores expressos nessas regiões (Meng et al., 2005). De fato, os antagonistas seletivos dos receptores μ -opioide são mais eficazes do que doses equipotentes de antagonistas não seletivos no bloqueio dos efeitos antinociceptivos mediados pelo sistema descendente (Budai & Fields, 1998; Kiefel et al., 1993) (uma descrição da possível localização destes dois subtipos de receptores opioides na PAG e no RVM está apresentada na Figura II, seção de Introdução).

A atividade neuronal, indiretamente estimada pela expressão de c-Fos, no NAc, PAG e RVM dá suporte as observações comportamentais. No NAc, houve um aumento na expressão de c-Fos com a hiperalgesia induzida por carragenina, um efeito não observado quando a capsaicina foi injetada na pata dianteira de animais que receberam carragenina ou veículo na pata traseira (Figure 6A). Sabe-se que a atividade do NAc é pró-nociceptiva e que a analgesia mediada pelo controle nociceptivo ascendente depende da inibição do NAc (Gear & Levine, 2011), portanto, o aumento da expressão de c-Fos nos animais que receberam apenas injeção de carragenina pode refletir o aumento da atividade do NAc durante a hiperalgesia. Adicionalmente, a diminuição da expressão de c-Fos nos animais que receberam injeção de capsaicina pode refletir a inibição do NAc para induzir antinocicepção.

Na PAG, a expressão de c-Fos aumentou significativamente em resposta à estimulação periférica, não importando se fosse com carragenina, capsaicina ou ambas juntas (Figure 6C). O mesmo efeito foi observado dentro do RVM (Figure 6E), mas neste não houve diferença estatística. Isso pode refletir o aumento da atividade da PAG e do RVM durante a hiperalgesia inflamatória ou da analgesia endógena, algo esperado considerando o importante papel desses núcleos no processamento e

modulação da dor. De fato, estudos anteriores demonstraram aumento da expressão de c-Fos dentro do PAG e RVM em resposta a atividade nociceptiva (Han et al., 2003; Keay & Bandler, 1993) ou analgesia endógena (Lloyd et al., 2007).

O NAc é um alvo crítico do sistema mesolímbico dopaminérgico que, juntamente com seu papel bem conhecido em recompensa e motivação (Berridge & Kringelbach, 2015), mostrou ter um papel importante na modulação da dor (para excelentes revisões, veja (Baliki & Apkarian, 2015; Navratilova et al., 2015)). No entanto, no panorama atual da literatura, o sistema descendente e o mesolímbico parecem modular a dor através de mecanismos totalmente independentes, até o ponto que revisões importantes em cada sistema, mal mencionam um ao outro (Baliki & Apkarian, 2015; De Felice & Ossipov, 2016). De fato, embora a PAG esteja anatomicamente conectada com a área tegmental ventral e ao NAc (Kirouac et al., 2004; Suckow et al., 2013) e evidências da década de 90 que sugerem um loop bidirecional opioide entre estes núcleos (Ma & Han, 1991; Ma et al., 1992; Yu & Han, 1990), até onde sabemos, esta é a primeira evidência que liga os sistemas descendente e mesolímbico em um mecanismo endógeno de modulação da dor. Recentemente, Baliki e Apkarian (Baliki & Apkarian, 2015) propuseram que a experiência de dor aguda depende da transmissão nociceptiva periférica e de um fenômeno de limiar, responsável por determinar quando a nocicepção se torna perceptível como dor (Baliki & Apkarian, 2015). Este limiar entre dor e nocicepção acredita-se ser dependente da atividade mesolímbica, porém a base mecanicista subjacente não está clara. Os achados do presente estudo se encaixam bem como um possível mecanismo neste cenário, porque o sistema descendente possui uma poderosa capacidade de diminuir a transmissão nociceptiva, o que conseqüentemente aumenta o limiar de percepção da dor. Evidentemente, estudos adicionais são necessários para suportar essa ideia, bem como para determinar se o sistema mesolímbico se conecta com o sistema descendente através de circuitos corticais ou subcorticais.

Embora estudos prévios de imagem em cérebro humano tenham correlacionado indiretamente a atividade da PAG com a analgesia em resposta a alguns tipos de estimulação nociceptiva (Derbyshire & Osborn, 2009; Sprenger et al., 2011; Yelle et al., 2009), até onde sabemos, este estudo é a primeira evidência funcional que mostra que o sistema descendente PAG-RVM medeia a analgesia induzida pela dor. Durante situações de ameaça à sobrevivência, os mecanismos de

modulação da dor são ativados de forma preventiva, garantindo que o sujeito fique livre para se envolver em respostas defensivas. Mas se ocorrer uma intensa estimulação nociceptiva, podem ser necessários mecanismos adicionais para reprimir a percepção da dor e o controle nociceptivo ascendente pode ser o mecanismo recrutado para realizar essa tarefa. Nós sugerimos que o controle nociceptivo ascendente aumenta a ativação do sistema descendente inibitório, assegurando que o mecanismo de modulação da dor mais potente funcionará de forma ótima quando mais necessário, durante situações ameaçadoras acompanhadas de intensa dor aguda.

Em resumo, este estudo demonstra que a estimulação nociceptiva ativa uma via de modulação da dor ascendente-descendente que liga o sistema mesolímbico ao sistema descendente PAG-RVM. Acredita-se que o sistema mesolímbico codifique o valor, a relevância e a expectativa relacionados à experiência da dor (Baliki & Apkarian, 2015; Porreca & Navratilova, 2017) e selecione a ação comportamental mais vantajosa. A percepção da dor pode perturbar a expressão da ação comportamental selecionada. Uma excelente maneira de evitar que isso aconteça é aumentar o limiar de percepção da dor ativando o sistema de modulação da dor mais poderoso. O presente estudo apresenta um possível mecanismo para alcançar esse objetivo e adiciona peças importantes ao quebra-cabeça dos mecanismos endógenos de modulação da dor. A compreensão dos mecanismos endógenos de modulação da dor provou ser de grande valor para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da dor (Ossipov et al., 2010). Este estudo contribui para avançar nossa compreensão neste campo fascinante.

8 CONCLUSÃO

O controle nociceptivo ascendente está funcionalmente interligado ao sistema descendente PAG-RVM. Através de uma abordagem farmacológica, este estudo demonstrou que a antinocicepção induzida pela injeção de capsaicina (ferramenta utilizada para ativar o controle nociceptivo ascendente) foi prevenida por todas as intervenções supraespinhais conhecidas por bloquear o componente ascendente ou por intervenções padrões conhecidas por bloquear o descendente (PAG-RVM e medula espinhal). Isto nos permite afirmar que ambos mecanismos estão funcionalmente interligados. Esta é a primeira descrição de uma via espinhal-prosencéfalo-mesencéfalo-espinhal envolvida na modulação da dor.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alloui, A., Chassaing, C., Schmidt, J., Ardid, D., Dubray, C., Cloarec, A., & Eschalier, A. (2002). Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol*, *443*(1-3), 71-77.
- Araldi, D., Ferrari, L. F., Lotufo, C. M., Vieira, A. S., Athie, M. C., Figueiredo, J. G., . . . Parada, C. A. (2013). Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(9), 3603-3608. doi: 10.1073/pnas.1220668110
- Baliki, M. N., & Apkarian, A. V. (2015). Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. *Neuron*, *87*(3), 474-491. doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.005
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, *139*(2), 267-284. doi: S0092-8674(09)01243-4 [pii] 10.1016/j.cell.2009.09.028
- Berridge, K. C., & Kringelbach, M. L. (2015). Pleasure systems in the brain. *Neuron*, *86*(3), 646-664. doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.018
- Bonet, I. J., Fischer, L., Parada, C. A., & Tambeli, C. H. (2013). The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology*, *65*, 206-212. doi: S0028-3908(12)00511-4 [pii] 10.1016/j.neuropharm.2012.09.020
- Budai, D., & Fields, H. L. (1998). Endogenous opioid peptides acting at mu-opioid receptors in the dorsal horn contribute to midbrain modulation of spinal nociceptive neurons. *J Neurophysiol*, *79*(2), 677-687.
- Burrell, B. D. (2017). Comparative biology of pain: What invertebrates can tell us about how nociception works. *J Neurophysiol*, *117*(4), 1461-1473. doi: 10.1152/jn.00600.2016
- Dall'Acqua, M. C., Bonet, I. J., Zampronio, A. R., Tambeli, C. H., Parada, C. A., & Fischer, L. (2014). The contribution of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) to the in vivo nociceptive effects of prostaglandin E(2). *Life Sci*, *105*(1-2), 7-13. doi: 10.1016/j.lfs.2014.02.031
- De Felice, M., & Ossipov, M. H. (2016). Cortical and subcortical modulation of pain. *Pain Manag*, *6*(2), 111-120. doi: 10.2217/pmt.15.63
- Derbyshire, S. W., & Osborn, J. (2009). Offset analgesia is mediated by activation in the region of the periaqueductal grey and rostral ventromedial medulla. *Neuroimage*, *47*(3), 1002-1006. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.04.032
- Fields, H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci*, *5*(7), 565-575. doi: 10.1038/nrn1431 nrn1431 [pii]
- Gaskin, D. J., & Richard, P. (2012). The economic costs of pain in the United States. *J Pain*, *13*(8), 715-724. doi: 10.1016/j.jpain.2012.03.009
- Gear, R. W., Aley, K. O., & Levine, J. D. (1999). Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci*, *19*(16), 7175-7181.
- Gear, R. W., & Levine, J. D. (1995). Antinociception produced by an ascending spino-supraspinal pathway. *J Neurosci*, *15*(4), 3154-3161.

- Gear, R. W., & Levine, J. D. (2009). Rostral ventral medulla cholinergic mechanism in pain-induced analgesia. *Neurosci Lett*, *464*(3), 170-172. doi: S0304-3940(09)01113-6 [pii]
10.1016/j.neulet.2009.08.036
- Gear, R. W., & Levine, J. D. (2011). Nucleus accumbens facilitates nociception. *Exp Neurol*, *229*(2), 502-506. doi: S0014-4886(11)00105-1 [pii]
10.1016/j.expneurol.2011.03.021
- Han, F., Zhang, Y. F., & Li, Y. Q. (2003). Fos expression in tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat brainstem after visceral noxious stimulation: an immunohistochemical study. *World J Gastroenterol*, *9*(5), 1045-1050.
- Harris, J. A. (1996). Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. *J Physiol Paris*, *90*(1), 15-25.
- Holden, J. E., Farah, E. N., & Jeong, Y. (2005). Stimulation of the lateral hypothalamus produces antinociception mediated by 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT3 receptors in the rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience*, *135*(4), 1255-1268. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.023
- Holmes, B. B., & Fujimoto, J. M. (1992). Naloxone and norbinaltorphimine administered intracerebroventricularly antagonize spinal morphine-induced antinociception in mice through the antianalgesic action of spinal dynorphin A (1-17). *J Pharmacol Exp Ther*, *261*(1), 146-153.
- Katz, N. (2002). The impact of pain management on quality of life. *J Pain Symptom Manage*, *24*(1 Suppl), S38-47.
- Keay, K. A., & Bandler, R. (1993). Deep and superficial noxious stimulation increases Fos-like immunoreactivity in different regions of the midbrain periaqueductal grey of the rat. *Neurosci Lett*, *154*(1-2), 23-26.
- Kiefel, J. M., Rossi, G. C., & Bodnar, R. J. (1993). Medullary mu and delta opioid receptors modulate mesencephalic morphine analgesia in rats. *Brain Res*, *624*(1-2), 151-161.
- Kirouac, G. J., Li, S., & Mabrouk, G. (2004). GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, *469*(2), 170-184. doi: 10.1002/cne.11005
- Lane, D. A., Patel, P. A., & Morgan, M. M. (2005). Evidence for an intrinsic mechanism of antinociceptive tolerance within the ventrolateral periaqueductal gray of rats. *Neuroscience*, *135*(1), 227-234. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.014
- Lau, B. K., & Vaughan, C. W. (2014). Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Curr Opin Neurobiol*, *29*, 159-164. doi: 10.1016/j.conb.2014.07.010
- Le Bars, D. (2002). The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurones. *Brain Res Brain Res Rev*, *40*(1-3), 29-44.
- Loyd, D. R., Morgan, M. M., & Murphy, A. Z. (2007). Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception. *Neuroscience*, *147*(2), 456-468. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.03.053
- Lux, F., Welch, S. P., Brase, D. A., & Dewey, W. L. (1988). Interaction of morphine with intrathecally administered calcium and calcium antagonists: evidence for supraspinal endogenous opioid mediation of intrathecal calcium-induced antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, *246*(2), 500-507.

- Ma, Q. P., & Han, J. S. (1991). Neurochemical studies on the mesolimbic circuitry of antinociception. *Brain Res*, 566(1-2), 95-102.
- Ma, Q. P., Shi, Y. S., & Han, J. S. (1992). Further studies on interactions between periaqueductal gray, nucleus accumbens and habenula in antinociception. *Brain Res*, 583(1-2), 292-295.
- McCarberg, B. H., Nicholson, B. D., Todd, K. H., Palmer, T., & Penles, L. (2008). The impact of pain on quality of life and the unmet needs of pain management: results from pain sufferers and physicians participating in an Internet survey. *Am J Ther*, 15(4), 312-320. doi: 10.1097/MJT.0b013e31818164f2
- Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150(3699), 971-979.
- Meng, I. D., Johansen, J. P., Harasawa, I., & Fields, H. L. (2005). Kappa opioids inhibit physiologically identified medullary pain modulating neurons and reduce morphine antinociception. *J Neurophysiol*, 93(3), 1138-1144. doi: 10.1152/jn.00320.2004
- Merskey, H., & Bogduk, N. (1994). *Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms* (2 ed.). Seattle: IASP Press.
- Miaskowski, C., & Levine, J. D. (1992). Inhibition of spinal opioid analgesia by supraspinal administration of selective opioid antagonists. *Brain Res*, 596(1-2), 41-45. doi: 0006-8993(92)91530-R [pii]
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66(6), 355-474.
- Navratilova, E., Atcherley, C. W., & Porreca, F. (2015). Brain Circuits Encoding Reward from Pain Relief. *Trends Neurosci*, 38(11), 741-750. doi: 10.1016/j.tins.2015.09.003
- Nir, R. R., & Yarnitsky, D. (2015). Conditioned pain modulation. *Curr Opin Support Palliat Care*, 9(2), 131-137. doi: 10.1097/SPC.0000000000000126
- Ossipov, M. H., Dussor, G. O., & Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. *J Clin Invest*, 120(11), 3779-3787. doi: 10.1172/JCI43766
- Ozdemir, E., Gursoy, S., & Bagcivan, I. (2012). The effects of serotonin/norepinephrine reuptake inhibitors and serotonin receptor agonist on morphine analgesia and tolerance in rats. *J Physiol Sci*, 62(4), 317-323. doi: 10.1007/s12576-012-0207-x
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). New York: Academic Press.
- Porreca, F., & Navratilova, E. (2017). Reward, motivation, and emotion of pain and its relief. *Pain*, 158 Suppl 1, S43-S49. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000798
- Pud, D., Granovsky, Y., & Yarnitsky, D. (2009). The methodology of experimentally induced diffuse noxious inhibitory control (DNIC)-like effect in humans. *Pain*, 144(1-2), 16-19. doi: 10.1016/j.pain.2009.02.015
- Randall, L. O., & Selitto, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 111(4), 409-419.
- Schmidt, B. L., Tambeli, C. H., Barletta, J., Luo, L., Green, P., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2002a). Altered nucleus accumbens circuitry mediates pain-induced antinociception in morphine-tolerant rats. *J Neurosci*, 22(15), 6773-6780. doi: 20026639
22/15/6773 [pii]
- Schmidt, B. L., Tambeli, C. H., Gear, R. W., & Levine, J. D. (2001). Nicotine withdrawal hyperalgesia and opioid-mediated analgesia depend on nicotine

- receptors in nucleus accumbens. *Neuroscience*, 106(1), 129-136. doi: S0306-4522(01)00264-0 [pii]
- Schmidt, B. L., Tambeli, C. H., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2002b). mu/delta Cooperativity and opposing kappa-opioid effects in nucleus accumbens-mediated antinociception in the rat. *Eur J Neurosci*, 15(5), 861-868. doi: 1915 [pii]
- Silva, J. R., Silva, M. L., & Prado, W. A. (2011). Analgesia induced by 2- or 100-Hz electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the activation of different descending pain inhibitory mechanisms. *J Pain*, 12(1), 51-60. doi: S1526-5900(10)00490-6 [pii]
10.1016/j.jpain.2010.04.008
- Song, Z., Ansah, O. B., Meyerson, B. A., Pertovaara, A., & Linderoth, B. (2013). Exploration of supraspinal mechanisms in effects of spinal cord stimulation: role of the locus coeruleus. *Neuroscience*, 253, 426-434. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.006
- Sprenger, C., Bingel, U., & Buchel, C. (2011). Treating pain with pain: supraspinal mechanisms of endogenous analgesia elicited by heterotopic noxious conditioning stimulation. *Pain*, 152(2), 428-439. doi: 10.1016/j.pain.2010.11.018
- Suckow, S. K., Deichsel, E. L., Ingram, S. L., Morgan, M. M., & Aicher, S. A. (2013). Columnar distribution of catecholaminergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray and their relationship to efferent pathways. *Synapse*, 67(2), 94-108. doi: 10.1002/syn.21624
- Tambeli, C. H., Fischer, L., Monaliza, S. L., Menescal-de-Oliveira, L., & Parada, C. A. (2012). The functional role of ascending nociceptive control in defensive behavior. *Brain Res*, 1464, 24-29. doi: 10.1016/j.brainres.2012.05.010
- Tambeli, C. H., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2009). Centralization of noxious stimulus-induced analgesia (NSIA) is related to activity at inhibitory synapses in the spinal cord. *Pain*, 143(3), 228-232. doi: S0304-3959(09)00154-7 [pii]
10.1016/j.pain.2009.03.005
- Tambeli, C. H., Parada, C. A., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2002). Inhibition of tonic spinal glutamatergic activity induces antinociception in the rat. *Eur J Neurosci*, 16(8), 1547-1553. doi: 2204 [pii]
- Tambeli, C. H., Quang, P., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2003a). Contribution of spinal inhibitory receptors in heterosegmental antinociception induced by noxious stimulation. *Eur J Neurosci*, 18(11), 2999-3006. doi: 3031 [pii]
- Tambeli, C. H., Young, A., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2003b). Contribution of spinal glutamatergic mechanisms in heterosegmental antinociception induced by noxious stimulation. *Pain*, 106(1-2), 173-179. doi: S0304395903003324 [pii]
- Tobaldini, G., Aisengart, B., Lima, M. M., Tambeli, C. H., & Fischer, L. (2014). Ascending nociceptive control contributes to the antinociceptive effect of acupuncture in a rat model of acute pain. *J Pain*, 15(4), 422-434. doi: 10.1016/j.jpain.2013.12.008
- Tomim, D. H., Pontarolla, F. M., Bertolini, J. F., Arase, M., Tobaldini, G., Lima, M. M., & Fischer, L. (2016). The Pronociceptive Effect of Paradoxical Sleep Deprivation in Rats: Evidence for a Role of Descending Pain Modulation Mechanisms. *Mol Neurobiol*, 53(3), 1706-1717. doi: 10.1007/s12035-014-9059-0

- Vaughan, C. W., Ingram, S. L., Connor, M. A., & Christie, M. J. (1997). How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*, *390*(6660), 611-614. doi: 10.1038/37610
- Viisanen, H., Ansah, O. B., & Pertovaara, A. (2012). The role of the dopamine D2 receptor in descending control of pain induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat. *Brain Res Bull*, *89*(3-4), 133-143. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.08.002
- Welch, S. P., Stevens, D. L., & Dewey, W. L. (1992). A proposed mechanism of action for the antinociceptive effect of intrathecally administered calcium in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, *260*(1), 117-127.
- Yaksh, T. L., Yeung, J. C., & Rudy, T. A. (1976). Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Res*, *114*(1), 83-103.
- Yelle, M. D., Oshiro, Y., Kraft, R. A., & Coghill, R. C. (2009). Temporal filtering of nociceptive information by dynamic activation of endogenous pain modulatory systems. *J Neurosci*, *29*(33), 10264-10271. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4648-08.2009
- Yu, L. C., & Han, J. S. (1990). Habenula as a relay in the descending pathway from nucleus accumbens to periaqueductal grey subserving antinociception. *Int J Neurosci*, *54*(3-4), 245-251.
- Zhao, Z. Q. (2008). Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Prog Neurobiol*, *85*(4), 355-375. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.004