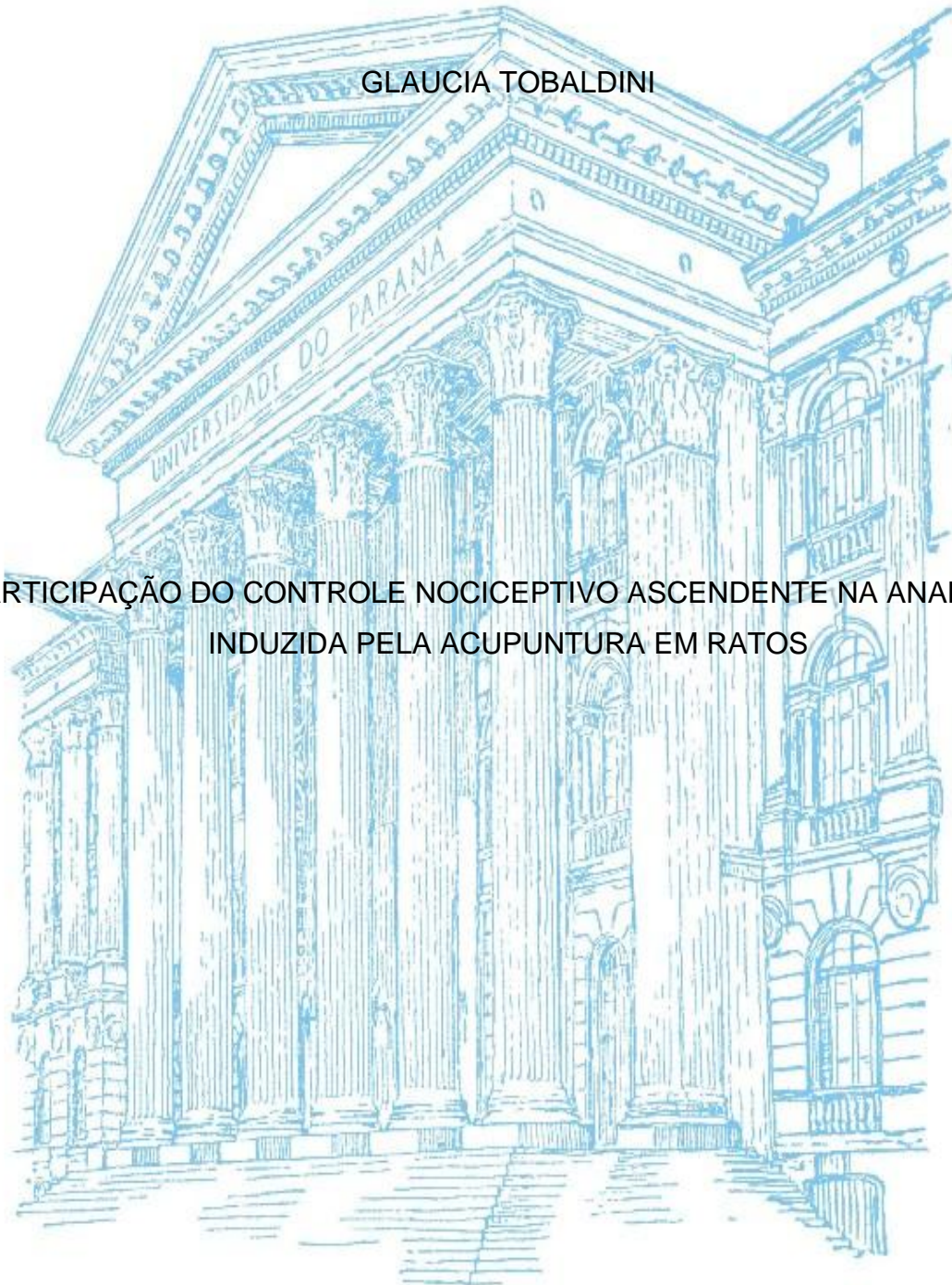


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GLAUCIA TOBALDINI

PARTICIPAÇÃO DO CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE NA ANALGESIA
INDUZIDA PELA ACUPUNTURA EM RATOS



CURITIBA

2012

GLAUCIA TOBALDINI

PARTICIPAÇÃO DO CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE NA ANALGESIA
INDUZIDA PELA ACUPUNTURA EM RATOS

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Luana Fischer.

CURITIBA

2012



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



Ata da defesa de dissertação de mestrado de GLAUCIA TOBALDINI

Aos trinta dias do mês de julho do ano de dois mil e doze, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **GLAUCIA TOBALDINI**, intitulada **“PARTICIPAÇÃO DO CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE NA ANALGESIA INDUZIDA PELA ACUPUNTURA EM RATOS”**. A abertura teve início às 15h00min 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 a palavra à aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora Luana Fischer passou à palavra ao primeiro examinador, Professora Doutora Maria Fernanda de Paula Werner do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Fernando Mazzilli Louzada do Departamento de Fisiologia da UFPR. 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 **“Aprovada”**, habilitando-a ao título de Mestre 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, Luana Fischer, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 30 de julho de dois mil e doze.

Professora Doutora Maria Fernanda de Paula Werner
UFPR- Membro Titular

Professor Doutor Fernando Mazzilli Louzada
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Luana Fischer
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram da caminhada e da conclusão deste trabalho.

Em especial, aos meus pais, Enio e Adelma, e meu irmão Leandro, pelo amor, apoio incondicional, ouvidos e muitas palavras. Sem vocês este trabalho não existiria.

Aos meus amigos de perto e de longe, que me apoiaram nos momentos de dificuldade e sorriram nos momentos de alegria, vocês são todos especiais. À Daniele Pegorini, por ter me acolhido no início e por ter apertado os laços da amizade, adorei tudo isso. À Andressa P. Martins, Betina Aisengart e Dabna H. Tomim pela parceria no laboratório, vocês vão rir, mas nossa harmonia tornou com certeza o trabalho mais fácil. À Claudia Pudell, Fabíola Nihi, Juliane Ceron e Priscilla Marys C. dos Santos, éramos (junto com a Andressa) quase uma república, obrigada pelos bons momentos juntas, foi muito bom ter conhecido vocês melhor. À Adriana A. Yamaguchi pelo carinho e pela boa amizade. À Keila Okuda Tavares, Fernanda De Ré, Rafael Traesel e Tatiana Abreu Ferreira, que mesmo longe estiveram sempre muito perto, apoiando e criticando quando preciso fosse.

Ao Isaac Aguiar Oliveira, que participou dos momentos críticos dessa etapa e com sua doçura me trouxe muita paz e alegria, você é muito especial.

À Universidade Federal do Paraná, e ao programa de Pós-graduação em Fisiologia, em especial à minha orientadora Luana Fischer, obrigada pela oportunidade de estar aqui.

Aos meus amigos e professores do departamento de Fisiologia da Universidade de Maringá, em especial à professora Rosângela F. Garcia pelo carinho e incentivos a seguir com a Fisiologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro ao meu projeto.

E por fim, e mais importante, à toda espiritualidade, obrigada.

RESUMO

A acupuntura é uma técnica milenar, na qual, pontos específicos do corpo (acupontos) são estimulados para tratar uma variedade de doenças, inclusive dor. A analgesia induzida pela acupuntura depende da ativação de fibras-C periféricas e subsequentemente de vias de modulação de dor. Dentre as vias de modulação de dor conhecidas, o controle nociceptivo ascendente (ANC) é um dos mais recentemente descritos. Ele medeia uma forma de analgesia induzida por dor, i.e., antinocicepção heterosegmental induzida por estimulação nociceptiva. O ANC inclui mecanismos específicos na medula espinhal assim como um circuito no núcleo accumbens e no bulbo rostro ventral. O objetivo deste estudo é testar a hipótese de que o ANC medeia o efeito antinociceptivo da acupuntura. Acupuntura no ponto E36 (*Zusanli*), um acuponto amplamente utilizado e localizado na pata traseira, induziu potente antinocicepção heterosegmental no teste de formalina orofacial. A magnitude e o tempo de duração desse efeito antinociceptivo foi similar àquele induzido pela injeção intraplantar de capsaicina, um procedimento classicamente utilizado para ativar o ANC. O efeito antinociceptivo na região orofacial induzido pela acupuntura no ponto E36 foi bloqueado pela depleção de fibras-C no nervo ciático (pela administração perineural de capsaicina 1%); pela administração espinhal de antagonista de receptor μ -opioid (CTOP, 0.2 μ g) ou de GABA_A (bicuculina, 0.3 μ g); administração intra-núcleo accumbens de antagonista de receptor μ -opioid (CTOP, 1 μ g) ou administração intra-bulbo rostro ventral de antagonista de receptor nicotínico de acetilcolina (mecamilamina, 0.6 μ g). Estes procedimentos são os mesmos que bloqueiam a analgesia mediada pela ativação do ANC, assim, nós sugerimos que o ANC medeia o efeito antinociceptivo da acupuntura.

Palavras-chave: acupuntura, controle nociceptivo ascendente, analgesia, nocicepção, dor.

ABSTRACT

Acupuncture is an ancient technique in which specific body points (acupoints) are stimulated to treat a variety of diseases, including pain. Acupuncture-induced analgesia depends on the activation of primary C-fibers and subsequently of endogenous pain modulation pathways. Among endogenous pain modulation pathways, the ascending nociceptive control (ANC) is one of the most recently described. It mediates a form of pain-induced analgesia, i.e., noxious stimulus induced heterosegmental antinociception. ANC includes specific spinal cord mechanisms as well as circuitry in nucleus accumbens and in rostral ventral medulla. In this study we asked whether ANC mediates the antinociceptive effect of acupuncture. Acupuncture at ST36 (*Zusanli*), a widely used acupoint located in the hindlimb, induced potent heterosegmental antinociception in the orofacial formalin test. The magnitude and time-course of this antinociceptive effect was similar to that induced by an intraplantar injection of capsaicin, a procedure classically used to activate ANC. The antinociceptive effect of acupuncture at ST36 on the orofacial region was blocked by sciatic C-fibers depletion (by perineural administration of 1% capsaicin); spinal administration of a μ -opioid (CTOP, 0.2 μ g) or of a GABA_A (bicuculline, 0.3 μ g) receptor antagonist; intra-nucleus accumbens administration of a μ -opioid receptor antagonist (CTOP, 1 μ g) or intra-rostral ventral medulla administration of a nicotinic acetylcholine receptor antagonist (mecamylamine, 0.6 μ g). Since these procedures are known to block ANC-mediated analgesia, we suggest that ANC mediates the antinociceptive effect of acupuncture.

Keywords: Acupuncture, ascending nociceptive control, analgesia, nociception, pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura A - Representação esquemática das principais vias neuronais envolvidas na transmissão da informação nociceptiva e no sistema descendente de modulação da dor..	11
Figura B - Diagrama esquemático do circuito espinal envolvido no controle nociceptivo ascendente.....	14
Figura C - Circuito espinal que media o ANC.....	16
Figure 1 - The antinociceptive effect of hindlimb acupuncture or of C-fibers activation on orofacial formalin test.....	29
Figure 2 - Pharmacological blockade of spinal μ-opioid or GABA_A receptors blocked acupuncture-induced antinociception.....	31
Figure 3 - Pharmacological blockade of μ-opioid receptors located in nucleus accumbens blocked acupuncture-induced antinociception.	32
Figure 4 - Pharmacological blockade of nicotinic acetylcholine receptors located in rostral ventral medulla blocked acupuncture-induced antinociception.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 A HISTÓRIA DO CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE	15
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	20
4 ARTIGO CIENTÍFICO	21
<i>Ascending nociceptive control mediates the antinociceptive effect of acupuncture.....</i>	<i>21</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>22</i>
<i>Introduction</i>	<i>23</i>
<i>Materials and Methods.....</i>	<i>24</i>
<i>Results</i>	<i>28</i>
<i>Discussion</i>	<i>34</i>
5 DISCUSSÃO	39
<i>Analgesia induzida pela acupuntura ou pela ativação do ANC</i>	<i>39</i>
<i>Mecanismos espinhais envolvidos na antinocicepção induzida pela acupuntura</i>	<i>41</i>
<i>Envolvimento do núcleo accumbens na antinocicepção induzida pela acupuntura.....</i>	<i>42</i>
<i>Envolvimento do RVM na antinocicepção induzida pela acupuntura</i>	<i>43</i>
<i>Outros mecanismos.....</i>	<i>43</i>
<i>Papel fisiológico do ANC.....</i>	<i>44</i>
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

Dor, segundo definição da IASP (do inglês, *International Association for the Study of Pain*, 2011), é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano (MERSKEY; BOGDUK, 1994). A sensação de dor é um mecanismo de alerta que indica a presença de um estímulo lesivo ao organismo que acionará respostas protetoras apropriadas (WOOLF; SALTER, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001). O funcionamento adequado deste sistema é essencial para proteger o organismo contra danos teciduais. Entretanto, sob condições persistentes ou patológicas, este sistema pode tornar-se sensibilizado e a dor transforma-se em uma doença (ZEILHOFER, 2005).

O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, ou seja, a consequência da estimulação das fibras nociceptivas aferentes primárias por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos (BASBAUM et al., 2009). A informação nociceptiva é transmitida, através da liberação de glutamato e peptídeos neuromodulatórios, para os neurônios de segunda ordem localizados nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal. Os axônios dos neurônios de segunda ordem cruzam para o quadrante anterolateral contralateral para formar um trato ascendente, que termina no tronco cerebral e várias áreas distintas do tálamo, que contêm neurônios de ordem superiores que projetam para várias regiões corticais e medeiam os diferentes aspectos da experiência dolorosa (Figura A) (FIELDS, 2004). A percepção da dor depende destes componentes fisiológicos (sensoriais) e da integração com componentes emocionais (BASBAUM et al., 2009). Portanto, enquanto **dor** envolve a percepção de um estímulo aversivo, a **nocicepção** refere-se aos mecanismos neurofisiológicos gerados pelo estímulo nocivo. Em animais a dor pode ser avaliada indiretamente, através da observação comportamental evidenciada pela estimulação nociceptiva (LE BARS et al., 2001). Desta maneira, modelos animais de dor são de fato modelos de nocicepção, uma vez que a discriminação do componente emocional da dor é limitada (LE BARS et al., 2001).

A dor é considerada um dos maiores problemas de saúde pública da sociedade atual e embora o conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos tenha evoluído muito nos últimos anos, os fármacos utilizados para o controle da dor

atualmente pertencem à mesma classe de fármacos utilizados há décadas. Sendo basicamente analgésicos opioides e anti-inflamatórios os quais clinicamente apresentam um alto índice de insucessos e/ou de efeitos colaterais que se intensificam com o uso crônico. Para minimizar estes problemas, terapias alternativas para o tratamento da dor vêm sendo cada vez mais utilizadas, dentre essas terapias está a acupuntura. A **acupuntura** é originalmente uma técnica milenar chinesa, e consiste na aplicação de estímulos físicos, como inserção de agulhas filiformes, pressão manual, estimulação elétrica, calor (moxa), entre outros, sobre pontos específicos do corpo também chamados de acupontos. Embora milenar e largamente utilizada nos países asiáticos, esta terapia começou a ganhar evidência nos países ocidentais há poucas décadas. Em 2002, a Organização Mundial da Saúde divulgou 29 doenças que podem ser tratadas efetivamente com acupuntura, destas, 12 estão relacionadas com dor (HAN; HO, 2011). Mesmo com essa crescente investigação, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que levam a analgesia pela acupuntura. Porém, para que a técnica ganhe popularidade e aceitabilidade, é essencial que os mecanismos envolvidos na analgesia da acupuntura sejam esclarecidos.

Diversos estudos foram conduzidos ao longo das últimas décadas em busca de evidências sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos da acupuntura. Mecanismos periféricos e centrais parecem estar envolvidos na analgesia da acupuntura (ZHAO, 2008). A região de pele e músculo em torno do acuponto, quando comparada a um não-acuponto, apresenta alta densidade de campos receptivos e terminações nervosas (LI et al., 2004). Está bem determinado que a inserção das agulhas ativa fibras aferentes primárias, especialmente as fibras nociceptivas do tipo C (KIM et al., 2000; KAGITANI et al., 2010), que convergem para a medula espinhal ativando mecanismos espinhais essenciais para a analgesia induzida pela acupuntura.

Vários mecanismos supra-espinhais, que reconhecidamente participam da modulação da informação nociceptiva, medeiam a analgesia induzida pela acupuntura. Entre eles podemos citar o conhecido sistema endógeno de modulação descendente da dor (FIELDS, 2004), no qual múltiplas aferências provenientes do hipotálamo e do sistema límbico (incluindo a amígdala) convergem para a substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *Periaqueductal Gray*) e dali para o bulbo rostro ventral (RVM, do inglês *Rostral Ventral Medulla*), que controla a

transmissão nociceptiva no corno dorsal através de vias que descendem pelo funículo dorsolateral da medula espinhal (FIELDS, 2004) (Figura A).

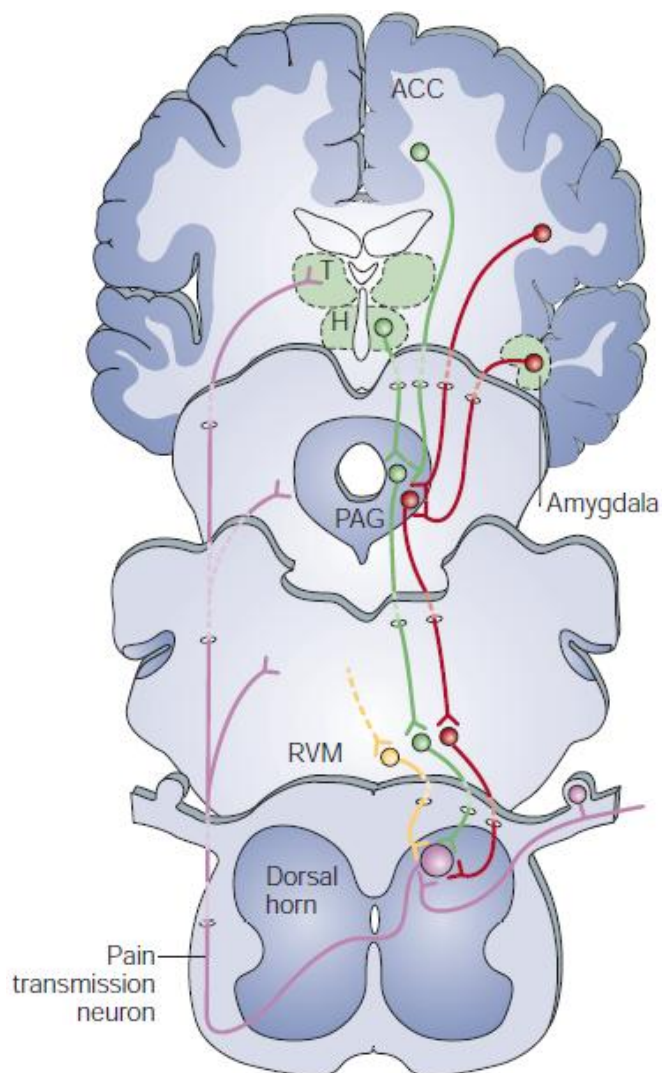


Figura A - Representação esquemática das principais vias neuronais envolvidas na transmissão da informação nociceptiva e no sistema descendente de modulação da dor. A informação nociceptiva (vias em lilás) é transmitida dos nociceptores primários para neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal (neurônios de segunda ordem). Os axônios desses neurônios atravessam para a região contralateral da medula espinhal, formando um trato que ascende pelo quadrante anterolateral e termina em distintas áreas do tronco cerebral e tálamo (T). A partir dessas regiões a informação nociceptiva é transmitida (por neurônios de terceira ordem) para diversas áreas corticais que controlam diferentes aspectos da experiência dolorosa. A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é a região que controla os mecanismos envolvidos no sistema descendente de modulação da dor (verde e vermelho). Para isso, integra múltiplas aferências provenientes diretamente da periferia e de áreas prosencefálicas límbicas (incluindo o córtex cingulado anterior, ACC), outras áreas corticais frontais, hipotálamo (H) e do núcleo central da amígdala. Ao ativar vias descendentes que partem do bulbo rostral (RVM) e trafegam pelo funículo dorsolateral, a PAG controla indiretamente a transmissão da informação nociceptiva no corno dorsal

medula espinhal. Essas vias descendentes podem exercer tanto controle inibitório (verde) quanto facilitatório (vermelho) da transmissão da informação nociceptiva ao nível do corno dorsal espinhal. Um canal de controle separado, através de neurônios serotoninérgicos no RVM (amarelo), também pode facilitar ou inibir a transmissão da informação nociceptiva (Figura adaptada de FIELDS, 2004).

Entre as várias evidências que apontam o sistema descendente como um importante mecanismo associado à analgesia induzida pela acupuntura podemos citar aquelas que demonstram que os mesmos procedimentos que bloqueiam a função desse sistema - como a microinjeção de antagonistas opioides na PAG (LIU, 1996; LIU et al., 1997; BAI et al., 1999) e no RVM (LIU, 1996) e a lesão do funículo dorsolateral da medula espinhal. (SHEN et al., 1978), por onde as vias descendentes transitam - inibem a analgesia induzida pela acupuntura. Outro

sistema de modulação associado à analgesia induzida pela acupuntura é o Controle Inibitório Difuso (DNIC, do inglês, *Diffuse Noxious Inhibitory Controls*), cuja ativação por um estímulo nociceptivo de grande intensidade diminui a dor provocada pela estimulação em uma região distante no corpo (heterosegmental). Este sistema depende de uma atividade espinhal excitatória e pode ser acionado por qualquer tipo de estímulo nociceptivo heterotópico, seja ele mecânico, térmico, químico ou elétrico, além disso, estímulos não nociceptivos são completamente ineficazes em ativar esse tipo de antinocicepção (LE BARS et al., 1992). Entre as várias evidências que apontam o DNIC como um mecanismo associado à analgesia induzida pela acupuntura podemos citar aquelas que demonstram que os mesmos procedimentos que bloqueiam a função desse sistema – como bloqueio de fibras-C, ou injeção sistêmica de antagonista de receptor opioide – inibem a analgesia induzida pela acupuntura (BING et al., 1990; OKADA et al., 1996; MURASE; KAWAKITA, 2000).

Dentre os sistemas endógenos de modulação da dor, o mais recentemente descrito e ainda pouco conhecido é o **Controle Nociceptivo Ascendente** (ANC, do inglês *Ascending Nociceptive Control*), cuja ativação produz analgesia semelhante à desencadeada por uma alta dose de morfina (10 mg/kg). O ANC 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*) (GEAR et al., 1999). Por exemplo, a injeção subdérmica de capsaicina na pata traseira, ou a imersão desta em água quente induz antinocicepção heterosegmental demonstrada pela atenuação do reflexo de abertura bucal (resposta reflexa dos músculos mastigatórios à estimulação nociceptiva do dente incisivo) (GEAR et al., 1999; SCHMIDT et al., 2002a; TAMBELLI et al., 2009). Tanto a capsaicina, um agonista de receptores TRPV1, quanto a estimulação térmica por altas temperaturas são estímulos que caracteristicamente ativam as fibras nociceptivas do tipo C, portanto é fácil concluir que a ativação do ANC depende da ativação dessas fibras na periferia.

O *Controle Nociceptivo Ascendente*, como o próprio nome refere, é uma via de modulação da dor que ascende da medula espinhal para o núcleo accumbens (GEAR; LEVINE, 1995; GEAR et al., 1999) e RVM (GEAR; LEVINE, 2009). O envolvimento dessas duas estruturas supra-espinhais foi determinado em experimentos que demonstraram que a analgesia induzida pela estimulação nociceptiva é bloqueada pela administração prévia de antagonista de receptor

opioide μ no núcleo accumbens (GEAR; LEVINE, 1995; TAMBELI et al., 2002), ou de receptor nicotínico de acetilcolina no RVM (GEAR; LEVINE, 2009). Uma série de estudos revelou os mecanismos espinhais responsáveis pela ativação do ANC. Por exemplo, antinocicepção heterosegmental pode ser induzida por inibição da atividade neural espinhal excitatória, isto é, por transecção cirúrgica da medula espinhal, ou ainda pelo bloqueio de receptores de aminoácidos excitatórios através da administração intratecal (i.t., entre segmentos lombares L4-5) de antagonistas do receptor AMPA ou mGluR1 (TAMBELI et al., 2002). O fato de a antinocicepção ser induzida pelo bloqueio espinhal de receptores AMPA ou mGluR1, sugere que em condições fisiológicas basais existe uma atividade tônica glutamatérgica na medula espinhal que quando inibida induz antinocicepção heterosegmental. A ativação das fibras nociceptivas periféricas (pela água quente ou pela capsaicina), portanto, deveria ativar um mecanismo espinhal inibitório que bloqueia essa atividade tônica ascendente, desinibindo o mecanismo supra-espinhal para produzir antinocicepção (TAMBELI et al., 2003a; TAMBELI et al., 2003b). Esta ideia é suportada por experimentos que demonstram que a administração intratecal de antagonistas de receptores inibitórios, como receptores opioides μ ou GABA_A (TAMBELI et al., 2003a) bloqueia a antinocicepção heterosegmental induzida pela estimulação nociceptiva periférica (Figura B).

Não há dados na literatura que demonstrem o envolvimento do ANC na analgesia induzida pela acupuntura, no entanto várias evidências apontam para essa possibilidade. Por exemplo, tanto a analgesia induzida pela acupuntura, quanto àquela induzida pela ativação do ANC, podem ser demonstradas em regiões corporais distantes daquela que recebeu o estímulo indutor (agulhamento ou estimulação nociceptiva, respectivamente) e dependem, da ativação periférica de fibras nociceptivas do tipo C e de mecanismos na medula espinhal, no núcleo accumbens e no RVM. Portanto, é provável que a acupuntura induza analgesia ao ativar o controle nociceptivo ascendente.

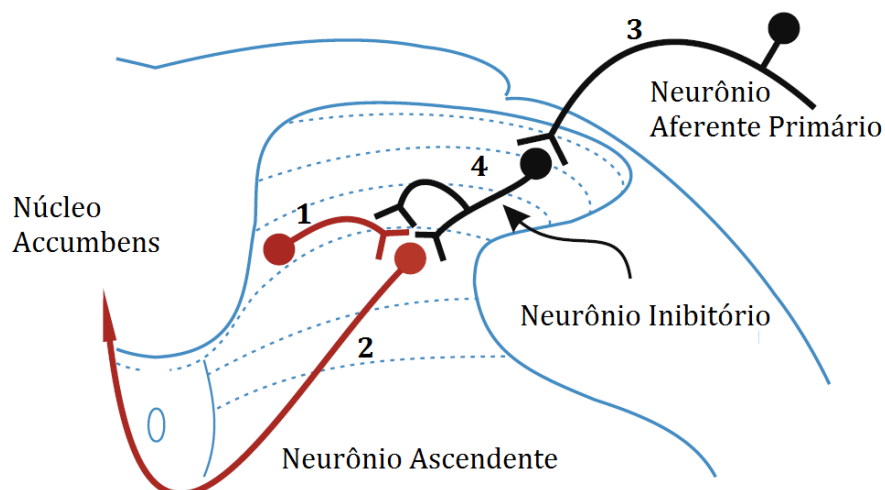


Figura B - Diagrama esquemático do circuito espinhal envolvido no controle nociceptivo ascendente. Sob **condições basais**, o neurônio #1 encontra-se tonicamente ativo resultando em uma atividade glutamatérgica que ativa o neurônio de projeção #2 através da ativação pós-sináptica de receptores excitatórios como AMPA e mGluR1, o que resulta em **inibição da antinocicepção mediada pelo núcleo accumbens** (TAMBELI et al., 2002) e RVM. O neurônio #4 é um interneurônio inibitório que é ativado por glutamato, liberado a partir dos nociceptores aferentes primários (#3) em resposta a aplicação de um estímulo nociceptivo (TAMBELI et al., 2003b). A ativação do interneurônio inibitório libera GABA e opioides endógenos que por sua vez inibem a atividade ascendente tônica do neurônio #2 resultando em antinocicepção heterosegmental, mediada pela desinibição do mecanismo supra-espinhal e consequente liberação de opioides endógenos no núcleo accumbens (TAMBELI et al., 2003a) e acetilcolina no bulbo rostro-ventral (GEAR; LEVINE, 2009) (Figura adaptada de TAMBELI et al., 2009).

2 A HISTÓRIA DO CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE

Uma série de estudos conduzidos no final da década e 80 e início da década de 90 demonstrou que o efeito antinociceptivo de agonistas opioides administrados intratecalmente, na região lombar da medula espinhal, pode ser antagonizado, pelo menos em parte, por infusão intracerebroventricular de antagonista opioide (LUX et al., 1988; HOLMES; FUJIMOTO, 1992; MIASKOWSKI; LEVINE, 1992; WELCH et al., 1992). Estas observações nos fazem sugerir que a ativação de receptores opioides espinhais pode promover liberação supra-espinhal de opioides endógenos o que contribuiria para o efeito antinociceptivo. Ou seja, surgiu a hipótese de que haveria um controle nociceptivo ascendente da medula espinhal para centros superiores (MIASKOWSKI; LEVINE, 1992).

No entanto, como o circuito neural envolvido no modelo experimental nociceptivo usado nesses estudos (ex. retirada da pata) localiza-se na mesma região da medula espinhal onde a droga era aplicada, não foi possível distinguir o efeito antinociceptivo da droga administrada espinhalmente dos efeitos heterosegmentais induzidos pela liberação supra-espinhal de opioides. Para avaliar apenas o efeito antinociceptivo heterosegmental das intervenções espinhais, o reflexo de abertura bucal foi escolhido como modelo experimental nociceptivo (GEAR; LEVINE, 1995). Ou seja, um modelo experimental onde o local de mensuração do reflexo difere do nível espinhal onde é realizada a administração de opioides ou outras substâncias.

Através da utilização desse modelo experimental, foi demonstrado que a antinocicepção heterosegmental pode ser induzida por inibição da atividade neural espinhal excitatória via: administração intratecal (i.t.) de agonista do receptor opioide μ , de anestésico local (GEAR; LEVINE, 1995), de bloqueadores de canais de cálcio (TAMBELI et al., 2002) ou transecção cirúrgica da medula espinhal (GEAR; LEVINE, 1995), ou ainda pelo bloqueio de receptores de aminoácidos excitatórios através da administração intratecal de antagonistas do receptor de AMPA ou de mGluR1 (TAMBELI et al., 2002). O efeito antinociceptivo de todas essas intervenções espinhais é bloqueado pela administração prévia de antagonista do receptor opioide μ ou de dopamina no núcleo accumbens (GEAR; LEVINE, 1995; TAMBELI et al., 2002), mas não em regiões que conhecidamente participam do

sistema de modulação de dor descendente, como núcleo magno da rafe e a substância cinzenta periaquedutal (GEAR; LEVINE, 1995). Tais observações nos fazem sugerir que, em condições fisiológicas, existe uma atividade tônica glutamatérgica (representada na Figura B pela célula número #1) na medula espinal que quando inibida induz antinocicepção mediada pela liberação de opioides endógenos no núcleo accumbens. Nenhum mecanismo de modulação de dor conhecido até então poderia justificar essas observações, sugerindo a existência de um novo sistema de controle nociceptivo que ascende da medula espinal ao núcleo accumbens.

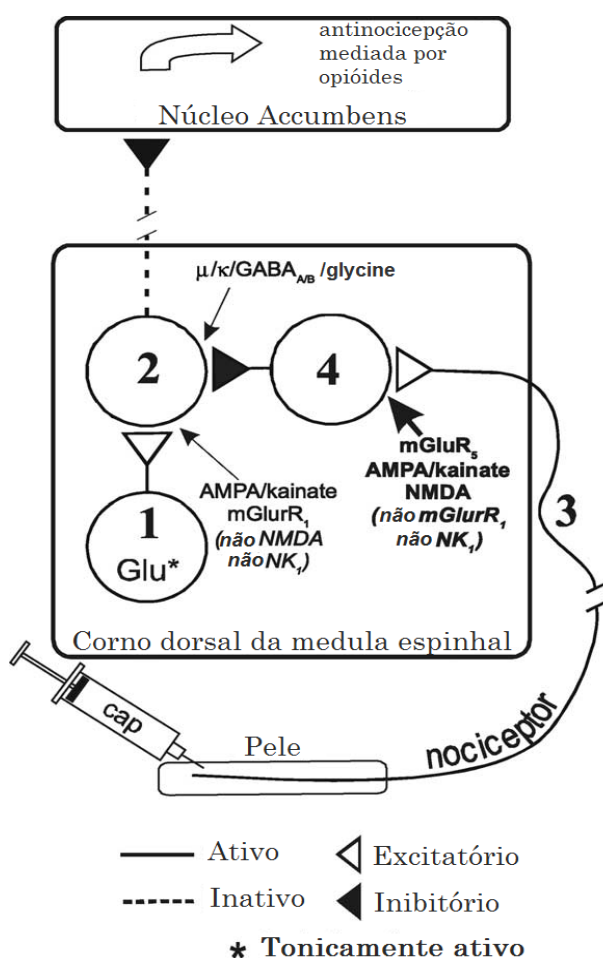


Figura C - Circuito espinal que media o ANC. Proposta de modelo do circuito espinal, onde neurônio #1, intrínseco da medula espinal, apresenta-se em atividade tônica glutamatérgica (Glu*), produzindo uma atividade contínua em um neurônio de projeção supra-espinal (#2), o que resulta em inibição da antinocicepção mediada pelo núcleo accumbens. As setas mostram quais são os neurotransmissores envolvidos em cada sinapse, e se a sinapse é inibitória ou excitatória. #3 neurônio aferente primário; cap, capsaicina (Figura adaptada de TAMBELLI;

YOUNG et al., 2003).

Dado que uma das principais funções da medula espinal é receber e processar impulsos sensoriais, o próximo passo foi testar a hipótese de que a ativação de neurônios sensoriais primários poderia induzir antinocicepção heterosegmental (GEAR et al., 1999). Assim sendo, foi demonstrado que a estimulação nociceptiva induzida tanto pela injeção subcutânea de capsaicina ou

pela imersão da pata em água quente produz uma profunda antinocicepção heterosegmental semelhante à produzida por alta dose (10 mg/Kg) de morfina subcutânea, a qual também é bloqueada pela administração de antagonistas de receptor opioide ou de dopamina no núcleo accumbens (GEAR et al., 1999). Estes resultados indicam que esse efeito antinociceptivo é mediado pelo mesmo sistema de controle nociceptivo ascendente descrito anteriormente.

Diante disso, foi sugerido que a estimulação nociceptiva periférica ativa um mecanismo espinhal inibitório que bloqueia a atividade tônica glutamatérgica na medula espinhal para induzir antinocicepção heterosegmental mediada por opioides endógenos no núcleo accumbens. Em suporte a essa idéia, foi demonstrado que a administração intratecal de antagonistas de receptores inibitórios como receptores opioides μ , GABA_A e GABA_B (TAMBELI et al., 2003a) bloqueia a antinocicepção heterosegmental induzida pela estimulação nociceptiva periférica. Além disso, antagonistas de NMDA, conhecidos em geral por produzir antinocicepção, quando administrados intratecal, também bloqueiam a antinocicepção heterosegmental induzida pela estimulação nociceptiva periférica (TAMBELI et al., 2003b).

Todos esses estudos demonstraram os mecanismos envolvidos na ativação do ANC, no entanto ainda era necessário determinar quais os mecanismos responsáveis pela longa duração da analgesia por ele mediada (maior que uma hora). O bloqueio neural periférico com anestésico local antes da estimulação nociceptiva bloqueia o ANC, já o mesmo bloqueio realizado posteriormente ao estímulo nociceptivo não tem efeito sobre a duração do ANC, o que sugere que o ANC não depende de uma atividade contínua em nociceptores aferentes primários (GEAR et al., 1999). Em suporte a essa idéia, foi demonstrado que a administração intratecal de antagonistas de receptores inibitórios GABA_B e μ -opioide, mas não de antagonista de receptores excitatórios NMDA e mGluR₅ bloqueia a longa duração do ANC, indicando que o ANC é mantido (após a retirada do estímulo periférico) por uma atividade contínua de sinapses inibitórias na medula espinhal (TAMBELI et al., 2009).

O relativamente profundo conhecimento dos mecanismos espinais envolvidos no ANC contrasta com o limitado conhecimento dos mecanismos supraespinhais. Os mecanismos pós-núcleo accumbens envolvidos na analgesia mediada pelo ANC não estão claros. No entanto, uma vez que a antinocicepção heterogemental depende da inibição de uma atividade espinhal ascendente tônica

que desinibe um mecanismo opioide no núcleo accumbens para induzir analgesia, a ativação de receptores opioides neste núcleo poderia ter uma, de duas funções (a) desinibir uma eferência antinociceptiva, a exemplo do que acontece no sistema PAG-RVM ou (b) inibir a atividade eferente pró-nociceptiva do núcleo accumbens para, então, produzir antinocicepção (GEAR; LEVINE, 1995; 2011). Um estudo recente comprovou a segunda hipótese ao demonstrar que a injeção intra-núcleo accumbens de lidocaína, um anestésico local, promoveu antinocicepção por si só, por bloquear as eferências do núcleo accumbens. Além disso, a antinocicepção induzida pela administração de agonistas opioides no núcleo accumbens não foi afetada pela administração posterior de lidocaína (GEAR; LEVINE, 2011). Uma questão que emerge naturalmente dessas observações experimentais é se o aumento da atividade eferente excitatória do núcleo accumbens poderia aumentar a nocicepção. De fato, a injeção intra-núcleo accumbens de agonista de aminoácido excitatório kainato resultou em aumento da resposta nociceptiva. Juntos estes resultados demonstram que o núcleo accumbens pode apresentar modulação bidirecional da resposta nociceptiva, ou seja, pode facilitar a nocicepção – papel pró-nociceptivo – ou inibi-la – papel antinociceptivo (GEAR; LEVINE, 2011).

Recentemente foi demonstrado o envolvimento do RVM na antinocicepção mediada pela ativação do ANC (GEAR; LEVINE, 2009). Foi demonstrado que a administração de agonista de receptores GABA_A (GEAR et al., 1999) ou de antagonista de receptores colinérgicos nicotínicos no RVM (GEAR; LEVINE, 2009) bloqueiam a antinocicepção mediada pela ativação do ANC. Embora o link entre o núcleo accumbens e o RVM não seja conhecido, esta conexão poderia ser mediada, baseada em algumas evidências, por projeções do núcleo accumbens, especialmente da via estriato-nigral, à substância negra pars reticulata, e dessa ao núcleo tegmental pedúnculo-pontino (envolvido no processo nociceptivo) e então ao RVM (GEAR; LEVINE, 2009).

O RVM é uma região supra-espinhal chave envolvida no sistema de modulação descendente da dor (PAG-RVM-medula espinhal). Todavia, a injeção de antagonistas opioide na PAG ou RVM, mecanismo clássico que bloqueia o sistema descendente, não bloqueia a analgesia mediada pelo ANC (GEAR; LEVINE, 1995) e embora o RVM apresente neurônios colinérgicos, evidências são contrárias a uma participação colinérgica entre PAG-RVM (BEHBEHANI, 1982). Portanto, é possível que o ANC represente um elemento até então desconhecido no sistema de

modulação da dor PAG-RVM, todavia, qualquer conexão funcional entre estes dois sistemas permanece por ser estabelecida (GEAR; LEVINE, 2009).

Embora a analgesia induzida pela ativação do ANC pareça, em alguns aspectos, àquela induzida pela ativação do DNIC (para revisão ver, LE BARS et al., 1992) – na qual um estímulo nociceptivo também diminui a resposta a outro estímulo aplicado em uma parte distante do corpo – este é mediado por atividade ascendente excitatória e não depende do núcleo accumbens para produzir seu efeito, tampouco a secção medular altera sua analgesia (LE BARS; VILLANUEVA, 1988; VILLANUEVA et al., 1988) enquanto o ANC depende da inibição de uma atividade ascendente tônica e é afetado pelos mecanismos já citados. Além disso, a analgesia induzida pela ativação do DNIC tem duração em torno de 5 (cinco) minutos, na maioria dos estudos, e é dependente da presença do estímulo nocivo (LE BARS et al., 1979), enquanto aquela induzida pelo ANC dura em torno de 2.5 h, e persiste mesmo após bloqueio neural periférico. Portanto, embora ambas as formas de analgesia sejam induzidas por estimulação nociceptiva, é pouco provável que seus mecanismos sejam os mesmos.

A finalidade biológica de um mecanismo para induzir analgesia em resposta à estimulação nociva não é clara. No entanto, um recente artigo de nosso grupo sugeriu um papel funcional ao ANC em comportamentos defensivos, especificamente, foi demonstrado que a ativação do ANC aumenta a resposta de imobilidade dorsal em ratos (TAMBELLI et al., 2012). A resposta de imobilidade ocorre durante os confrontos entre presa-predador e aumenta as chances de sobrevivência da presa, uma vez que o debater da presa parece ser necessário para que o predador continue o ataque (THOMPSON et al., 1981). O comportamento de imobilidade reflete um estado subjacente do medo e, nos seres humanos, é induzido no contexto de risco de morte ao sujeito (ROCHA-REGO et al., 2009). Portanto, a ativação de um mecanismo que induza analgesia e module comportamentos defensivos, em resposta a um estímulo nocivo, é de grande importância porque, a analgesia pode facilitar este tipo de comportamento defensivo e aumentar as chances de sobrevivência em situações de risco de morte.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Embora seja uma técnica milenar com eficácia comprovada, a acupuntura tem se tornado popular na sociedade ocidental nas últimas décadas. Essa crescente popularidade mundial se deve em grande parte a numerosos estudos científicos sobre os mecanismos neurofisiológicos que medeiam os efeitos da acupuntura. De fato, conhecer os mecanismos pelos quais a acupuntura induz analgesia é essencial para sustentá-la como alternativa livre de efeitos colaterais e eficaz no tratamento clínico da dor. Portanto, esse estudo se justifica por que investiga o envolvimento de um novo sistema de modulação endógeno da dor na analgesia induzida pela acupuntura.

O objetivo deste estudo é testar a hipótese de que o controle nociceptivo ascendente medeia a analgesia induzida pela acupuntura. Especificamente:

1-Demonstrar que a acupuntura, aplicada em um acuponto localizado na pata traseira, reduz o comportamento nociceptivo induzido pela injeção de formalina em uma região heterosegmental – o lábio superior.

2-Comparar o efeito antinociceptivo induzido pela acupuntura com aquele induzido por um procedimento classicamente utilizado para ativar o ANC – a estimulação nociceptiva da pata traseira pela injeção de capsaicina.

3-Verificar se a depleção das fibras nociceptivas do tipo C, pela administração da neurotoxina capsaicina no nervo ciático, bloqueia a analgesia induzida pela acupuntura;

4-Verificar se o bloqueio do controle nociceptivo ascendente ao nível espinhal, pela administração de antagonista de receptores opioides μ ou de receptores GABA_A, bloqueia a analgesia induzida pela acupuntura;

5-Verificar se o bloqueio do controle nociceptivo ascendente ao nível do núcleo accumbens, pela administração de antagonista de receptores opioides μ , bloqueia a analgesia induzida pela acupuntura;

6-Verificar se o bloqueio do controle nociceptivo ascendente ao nível do RVM, pela administração de antagonista de receptor nicotínico de acetilcolina, bloqueia a analgesia induzida pela acupuntura;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Ascending nociceptive control mediates the antinociceptive effect of acupuncture

Glaucia Tobaldini,^a Claudia H. Tambeli,^b Luana Fischer^a

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

^b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

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

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

Original Article

Keywords: Acupuncture, ascending nociceptive control, analgesia, nociception, pain

Abstract

Acupuncture is an ancient technique in which specific body points (acupoints) are stimulated to treat a variety of diseases, including pain. Acupuncture-induced analgesia depends on the activation of primary C-fibers and subsequently of endogenous pain modulation pathways. Among endogenous pain modulation pathways, the ascending nociceptive control (ANC) is one of the most recently described. It mediates a form of pain-induced analgesia, i.e., noxious stimulus induced heterosegmental antinociception. ANC includes specific spinal cord mechanisms as well as circuitry in nucleus accumbens and in rostral ventral medulla. In this study we asked whether ANC mediates the antinociceptive effect of acupuncture. Acupuncture at ST36 (*Zusanli*), a widely used acupoint located in the hindlimb, induced potent heterosegmental antinociception in the orofacial formalin test. The magnitude and time-course of this antinociceptive effect was similar to that induced by an intraplantar injection of capsaicin, a procedure classically used to activate ANC. The antinociceptive effect of acupuncture at ST36 on the orofacial region was blocked by sciatic C-fibers depletion (by perineural administration of 1% capsaicin); spinal administration of a μ -opioid (CTOP, 0.2 μ g) or of a GABA_A (bicuculline, 0.3 μ g) receptor antagonist; intra-nucleus accumbens administration of a μ -opioid receptor antagonist (CTOP, 1 μ g) or intra-rostral ventral medulla administration of a nicotinic acetylcholine receptor antagonist (mecamylamine, 0.6 μ g). Since these procedures are known to block ANC-mediated analgesia, we suggest that ANC mediates the antinociceptive effect of acupuncture.

Keywords: acupuncture, ascending nociceptive control, analgesia, nociception, pain.

Introduction

Acupuncture is an ancient Chinese technique in which specific body points (acupoints) are stimulated to treat a variety of diseases, including pain (ZHAO, 2008). The mechanisms underlying acupuncture-induced analgesia depend on the activation of primary sensory fibers, especially those of the C-type (KAGITANI et al., 2010), and subsequently of endogenous pain modulation pathways, such as the endogenous descending inhibitory system (TAKESHIGE et al., 1992) and diffuse noxious inhibitory control (DNIC) (BING et al., 1990).

Among endogenous pain modulation pathways, the ascending nociceptive control (ANC) is one of the most recently described (GEAR; LEVINE, 1995). It mediates a form of pain-induced analgesia, in which noxious stimulation induces potent antinociception that can be experimentally demonstrated in a body region remote from stimulation (*heterosegmental antinociception*). Under basal physiological conditions ANC-mediated analgesia is inhibited by an ongoing neural activity ascending from the spinal cord. Peripheral C-fiber stimulation activates inhibitory spinal mechanisms - dependent of μ -opioid and GABA receptors - that suppress the ongoing ascending activity, disinhibiting an opioidergic link in nucleus accumbens to produce antinociception (TAMBELLI et al., 2003a). Recent evidence included in this pathway a cholinergic mechanism in rostral ventral medulla (RVM) (GEAR; LEVINE, 2009). In this study we asked whether ANC mediates the antinociceptive effect of acupuncture. Acupuncture at ST36 (*Zusanli*), a widely used acupoint located in the hindlimb (HAN, 2011), was used to induce antinociception in the orofacial formalin test (RABOISSON; DALLEL, 2004). The injection of formalin into the upper lip was employed because it induces nociception segmentally remote from the hindlimb, where acupuncture was applied, thus allowing separation of heterosegmental effects from any intrasegmental effects that might influence assays. The involvement of ANC in acupuncture-induced analgesia was evaluated by the ability of procedures that block ANC, at spinal, nucleus accumbens and RVM levels, to block acupuncture-induced analgesia.

Materials and Methods

Animals

Experiments were performed on 200–280g male albino Wistar rats. The animals were maintained in a temperature-controlled room ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) on a 12:12 light–dark cycle with food and water available ad libitum. All animal experimental procedures and protocols were approved by the Ethics Animal Use Committee of the Federal University of Parana (protocol no. 480) and are in accordance with IASP guidelines for the study of pain in animals (ZIMMERMANN, 1983).

Drugs

Formalin (an aqueous solution of 37% of formaldehyde dissolved in 0.9% NaCl to 2.5% concentration); capsaicin, a transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) agonist (dissolved in 6% ethanol, 8% tween 80, and 86% 0.9% NaCl); Cys2,Tyr3, Orn5, Pen7amide (CTOP), a μ -opioid receptor antagonist (dissolved in 0.9% NaCl); bicuculline, a GABA_A receptor antagonist (dissolved in DMSO 0.6%) and mecamlamine, a nicotinic acetylcholine receptor antagonist (dissolved in 0.9% NaCl). All were obtained from Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Formalin test

The orofacial formalin test was conducted as described by Raboisson and Dallel (2004), with minor modifications. Briefly, animals were placed individually in a test chamber (30 x 30 x 30 cm mirrored-wood chamber with glass at the front side) for a 10 minutes habituation period to minimize stress. Then the animals were gently held and received a subcutaneous injection (30 μl) of formalin (2.5%) or its vehicle into the upper lip using a 26 gauge needle connected to a polyethylene tube (PE- 50; Intramedic, Clay Adams, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and also to a 50 μl syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). The animals were immediately returned to the test chamber for counting nociceptive behavior, characterized by rubbing the injected area with its fore or hind paws. The time each animal spent rubbing the injected area was recorded cumulatively (using a stopwatch), in consecutive 3-min blocks, over a period of 45 or 60 min. Face rubbing behavior was used as a quantitative measure of nociception and was presented in figures as mean \pm SEM.

Acupuncture

Rats were gently handled for at least one week prior to the experiments. A small area of skin overlying the hindlimb region was shaved with an electric razor. Manual acupuncture was performed by inserting a stainless steel needle (0.18 × 8 mm) to a depth of about 4–5 mm at right ST36 (*Zusanli*) acupoint, located, in the rat, below the capitulum fibulae and lateral to the tibia (BING et al., 1990). An adhesive tape was placed over the needle to protect the area during treatment. The animals were allowed to rest, with the needle inserted, for 20 min in their home-cages and into the test chamber for a 10 min habituation period, totalizing 30 minutes of acupuncture treatment. During this period, the animals were not restrained and no signs of distress were observed. Control animals (sham acupuncture groups) underwent the same procedure but no needle was inserted.

Intraplantar injections

The injections into the plantar surface of the right hindpaw (30 µl) were performed using a 26 gauge needle connected to a PE-50 and also to a 50 µl Hamilton syringe. Animals were gently held and capsaicin or its vehicle was injected at two different doses, dependent of the experimental purpose. To activate ANC, we used capsaicin at 100 µg, which is the lowest dose able to induced heterosegmental antinociception, as previously standardized (GEAR et al., 1999). To confirm whether perineural capsaicin treatment effectively depleted sciatic C-fibers, we used capsaicin at 1 µg (GILCHRIST et al., 1996), which is a low dose able to induce significant nociceptive flinch behavior. Before this injection, the animals were placed individually in a test chamber (30 x 30 x 30 cm mirrored-wood chamber with glass at the front side) for a 10 minutes habituation period to minimize stress. After injection, animals were immediately returned to the test chamber for counting nociceptive behavior, characterized by flinching the injected paw, over a period of 5 min. The absence of flinch behavior (presented in results as mean ± SEM) in animals pretreated with perineural capsaicin (compared to those pretreated with vehicle) was used as indicative of C-fiber depletion.

Perineural capsaicin

The protocol for perineural administration of capsaicin, a procedure known to selectively deplete C-fibers, was performed as previously described (SZIGETI et al., 2012). Briefly, the rats were previously anesthetized with an intramuscular injection of xylazine (3 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). A small area of the skin overlying the

right hindlimb was shaved with an electric razor. The right sciatic nerve, which innervates ST36 area (KAGITANI et al., 2010) and the hindpaw, was exposed high in the thigh and a small piece of cotton was moistened with a solution of capsaicin (1%, 0.1 ml, SZIGETI et al., 2012) or its vehicle and wrapped around the nerve. After 20 min, the cotton piece was removed and the wound was closed. After surgeries the animals received dipyrone (50mg/kg) and enrofloxacin (0.5 mg/kg) and the experiments were carried out 5 days later.

Intrathecal drug administration

The method for intrathecal (i.t.) injection was based on the technique of Papir-Kricheli and colleagues (PAPIR-KRICHELI et al., 1987). Briefly, for each injection, rats were anesthetized with halothane and dorsally positioned. A small area of skin overlying the lumbar region was shaved with an electric razor. A 26 gauge needle was inserted in the subarachnoid space on the midline between L4 and L5 vertebrae and the injections were performed at a rate of 1 μ l/s. CTOP (0.2 μ g, TAMBELI et al., 2003a), bicuculline (0.3 μ g, TAMBELI et al., 2003a) or vehicles were injected at a volume of 10 μ l. The animals regained consciousness approximately 1 min after discontinuing the anesthetic.

Nucleus accumbens and rostral ventral medulla drug administration

The rats were previously anesthetized by an intramuscular injection of xylazine (3 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). A 23 gauge stainless steel guide cannula was stereotaxically positioned and fixed into place with orthodontic resin (L.D. Caulk Co., Milford, DE, USA). After surgeries the animals received dipyrone (50mg/kg) and enrofloxacin (0.5 mg/kg) and experiments were carried out 7 days later. Bilateral intra-nucleus accumbens CTOP (1 μ g, SCHMIDT et al., 2002b) or vehicle administration was accomplished via insertion of a 30 gauge stainless steel injection cannula (1.3 mm rostral, 7.2 mm ventral, and \pm 1.8 mm lateral from bregma), which extended 2 mm beyond the guide cannulas, connected to a PE-10 and also to a 2 μ l Hamilton syringe (SCHMIDT et al., 2002b). Intra-RVM mecamylamine (0.6 μ g, GEAR; LEVINE, 2009) or vehicle administration was accomplished via insertion of a 30 gauge stainless steel injection cannula (2.3 mm caudal and 0.2 mm ventral to the intra-aural line), which extended 5 mm beyond the guide cannula, connected to a 2 μ l syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). Injection volume in all experiments was 0.5 μ l carried out over a period of 2 minutes. Injection cannula was left in place for an additional period of 30 seconds after injection. Injection sites were verified by

injecting Evans blue dye (1%, 0.5 μ l) and performing 50 μ m postmortem coronal sections (PAXINOS; WATSON, 2007) to determine the location of the dye (GEAR; LEVINE, 1995).

Data analysis

Two-way repeated measures ANOVA with one between-subjects factor (treatment) and one within-subjects factor (time) was used to determine if there were significant differences in nociceptive response among the groups in figure 1 A. Two-way ANOVA with two between subject factors (acupuncture and drug treatment) was used to determine if there were significant differences in nociceptive responses among the groups in the subsequent experiments. The Tukey post hoc test was employed to determine the basis of significant differences. The level for statistical significance was $p < 0.05$.

Results

Antinociceptive effect of acupuncture at ST 36 on the orofacial region

Injection of formalin (2.5%) into the upper lip induced a significant nociceptive behavior characterized by rubbing the injected area. As shown in figure 1A, the nociceptive response was typically biphasic, with an early and short-lasting first phase followed, after a quiescent period, by a second, prolonged tonic phase that lasted around forty minutes after injection. Acupuncture at ST36 significantly decreased formalin-induced orofacial nociception, an effect evident in the first phase and in the most of second phase. Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant main effect of treatment (eg., acupuncture or sham acupuncture, $F = 87.62$; $p < 0.001$) and a significant treatment \times time interaction ($F = 3.05$; $p < 0.001$, Figure 1A). Since formalin-induced nociceptive behavior was absent forty five minutes after injection and the effect of acupuncture and drug treatments were similar in the first and second phases, next data are presented as a sum of nociceptive behavior (first plus second phases) observed up to forty five minutes after formalin injection.

To demonstrate that noxious stimulation of the hindpaw is able to decrease nociception in the orofacial formalin test, we test the ability of intraplantar capsaicin (100 μ g), a procedure classically used to activate ANC, to decrease orofacial nociception. The intraplantar injection of capsaicin significantly decreased formalin-induced orofacial nociception (orofacial rubbing behavior in animals treated with intraplantar capsaicin 232.57 ± 41.01 , or vehicle 376.5 ± 14.22 , t test, $p = 0.01$, data not shown), suggesting that ANC activation induces heterosegmental antinociception in the orofacial formalin test.

To evaluate the contribution of peripheral C-fibers to acupuncture-induced antinociception, we test the ability of perineural administration of capsaicin (1%), a procedure known to selectively deplete C-fibers, to decrease acupuncture-induced antinociception. As shown in Figure 1B, the antinociceptive effect of acupuncture at ST36 on orofacial formalin test was prevented by perineural administration of capsaicin at sciatic nerve, which innervates ST36 area. There is a statistically significant interaction between acupuncture and capsaicin treatment, Two-way ANOVA and Tukey's test ($F = 6.35$, $p = 0.017$, Figure 1B). After this experiment, C-

fiber depletion was confirmed by the inability of an intraplantar hindpaw injection of capsaicin (1 μ g) to induce nociceptive behavior in animals pretreated with perineural capsaicin (flinch behavior in animals pretreated with perineural capsaicin 12.15 ± 2.21 , or vehicle 46.92 ± 7.42 , t test, $p < 0.001$, data not shown). Taken together these findings showed that the stimulation of an acupoint located in the hindlimb decreases nociception in a heterosegmental body region (the upper lip) and that this effect depends on the activation of C-Fibers located in the acupoint area.

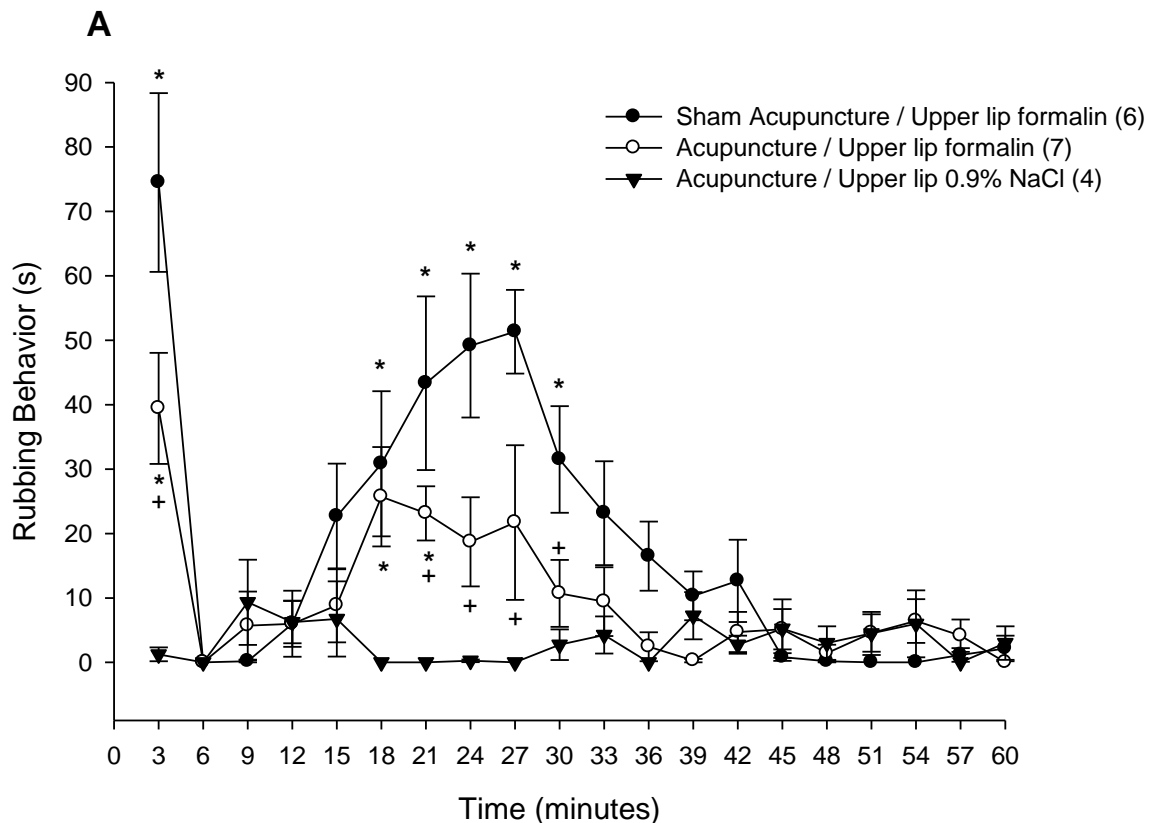
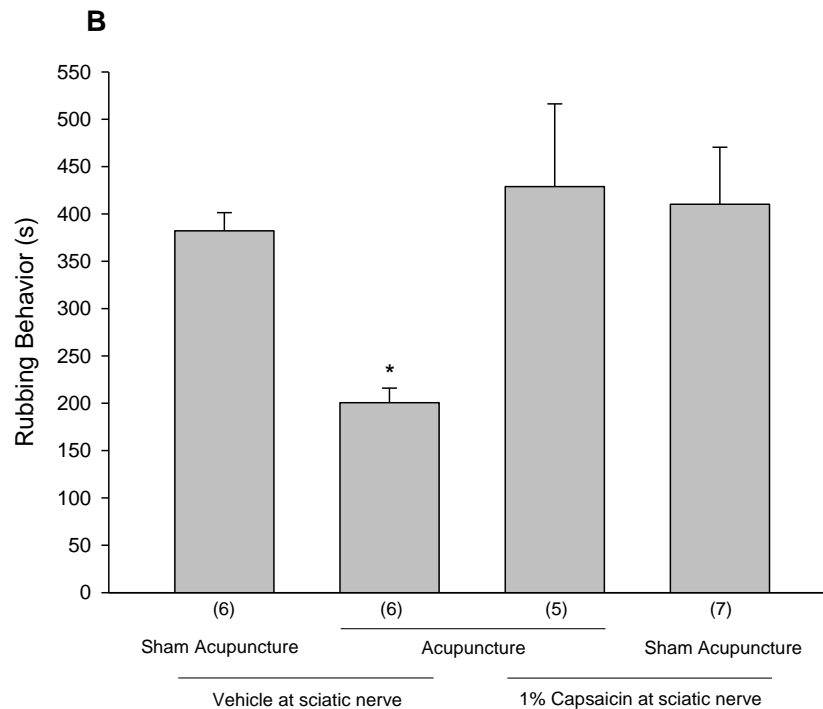


Figure 1 - The antinociceptive effect of hindlimb acupuncture or of C-fibers activation on orofacial formalin test. (A) Injection of formalin (2.5%) into the upper lip induced a biphasic nociceptive behavior (rubbing the injected area) that was significantly decreased by acupuncture (applied for thirty minutes before testing) at an acupoint located in the hindlimb (ST36). The symbols “*” indicate a behavioral response significantly higher than that induced by saline (0.9% NaCl). The symbols “+” indicate that formalin-induced nociceptive behavior was significantly lower in the acupuncture group than in the sham acupuncture one. The effect of different levels of treatment depends on what level of time is present, there is a statistically significant interaction between treatment and time (Two-Way Repeated Measure ANOVA and Tukey's test, $F = 3.05$, $p < 0.001$).



(B) Acupuncture at ST36 significantly decrease formalin-induced upper lip nociception in animals pre-treated with perineural vehicle (6% ethanol, 8% tween 80, and 86% 0.9% NaCl), an effect prevented by perineural administration of capsaicin (1%) at sciatic nerve. The symbol “*” indicates a nociceptive response significantly lower than that of the other groups. There is a statistically significant interaction between acupuncture and capsaicin treatment (Two-way ANOVA and Tukey’s test, $F = 6.35$, $p = 0.017$). In this and in subsequent figures, data are presented as mean \pm EPM. Numbers in parenthesis indicate the number of animals in each group. See methods for additional details regarding data presentation and analysis.

Acupuncture-induced antinociception is prevented by procedures known to block ascending nociceptive control at spinal level

To evaluate whether the blockade of ANC at spinal level affect acupuncture-induced antinociception we test the ability of intrathecal administration of CTOP (0.2 μ g) or of bicuculline (0.3 μ g), at doses known to block ANC-induced antinociception, to decrease acupuncture-induced antinociception. As show in Figure 2A, the antinociceptive effect of acupuncture at ST36 on orofacial formalin test was prevented by intrathecal administration (L4-5, previously to acupuncture treatment) of the μ -opioid receptor antagonist, CTOP (0.2 μ g). There is a statistically significant interaction between acupuncture and CTOP treatment, Two-way ANOVA and Tukey’s test ($F = 5.38$, $p = 0.032$, Figure 2A). Figure 2B shows that the antinociceptive effect of acupuncture at ST36 on orofacial formalin test was also prevented by intrathecal administration of the GABA_A receptor antagonist, bicuculline (0.3 μ g). There is a statistically significant interaction between acupuncture and bicuculline treatment, Two-way ANOVA and Tukey’s test ($F = 6.96$, $p = 0.014$, Figure

2B). Taken together, these findings demonstrated that, as well as ANC- induced analgesia, acupuncture-induced analgesia depends on spinal μ -opioid and GABA_A mechanisms, supporting the idea that activation of ANC mediates acupuncture-induced analgesia.

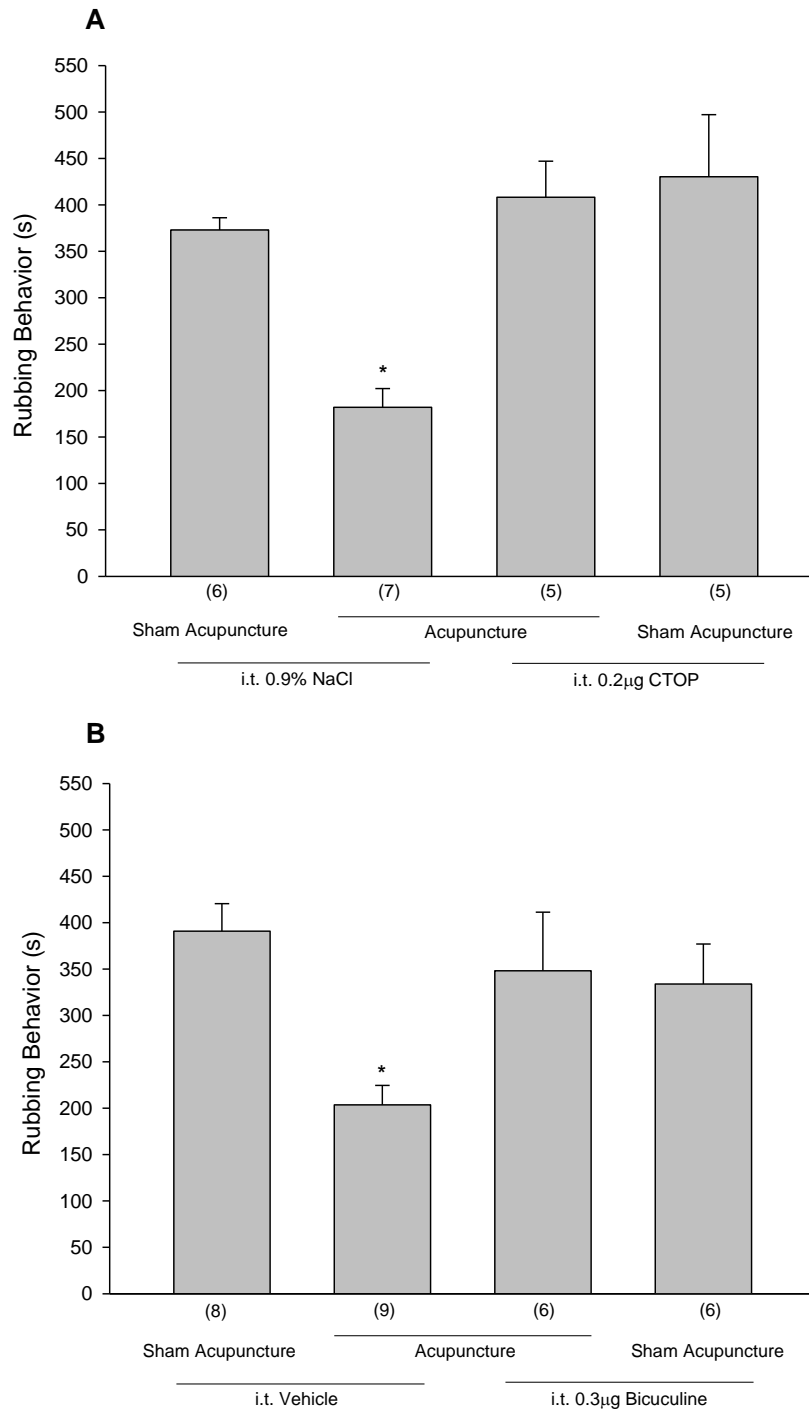


Figure 2 - Pharmacological blockade of spinal μ -opioid or GABA_A receptors blocked acupuncture-induced antinociception. The intrathecal (i.t.) administration of CTOP (**A**) or of bicuculline (**B**), at a dose known to block ANC-induced antinociception, prevented the antinociceptive effect of acupuncture on orofacial formalin test. The symbol “*” indicates a nociceptive behavior significantly lower than that of the other groups. There is a statistically significant interaction between acupuncture and CTOP or bicuculline treatment (Two Way ANOVA, Tukey’s test, Figure A, $F = 5.38$, $p = 0.032$; Figure B, $F = 6.96$, $p = 0.014$).

Acupuncture-induced antinociception is prevented by a procedure known to block ascending nociceptive control at nucleus accumbens level

To evaluate whether the blockade of ANC at nucleus accumbens level affect acupuncture-induced antinociception we evaluated the ability of intra-nucleus accumbens administration of CTOP, at a dose known to block ANC-induced antinociception, to decrease acupuncture-induced antinociception. As show in Figure 3A, the antinociceptive effect of acupuncture at ST36 on orofacial formalin test was prevented by intra-nucleus accumbens administration (prior to acupuncture) of the μ -opioid receptor antagonist, CTOP (1 μ g). There is a statistically significant interaction between acupuncture and CTOP treatment, Two-way ANOVA and Tukey's test ($F = 7.33$, $p = 0.013$, Figure 3A). Correct nucleus accumbens injection sites are shown in Figure 3B. This finding demonstrated that, as well as ANC- induced analgesia, acupuncture-induced analgesia depends on μ -opioid mechanisms on nucleus accumbens, supporting the idea that activation of ANC mediates acupuncture-induced analgesia.

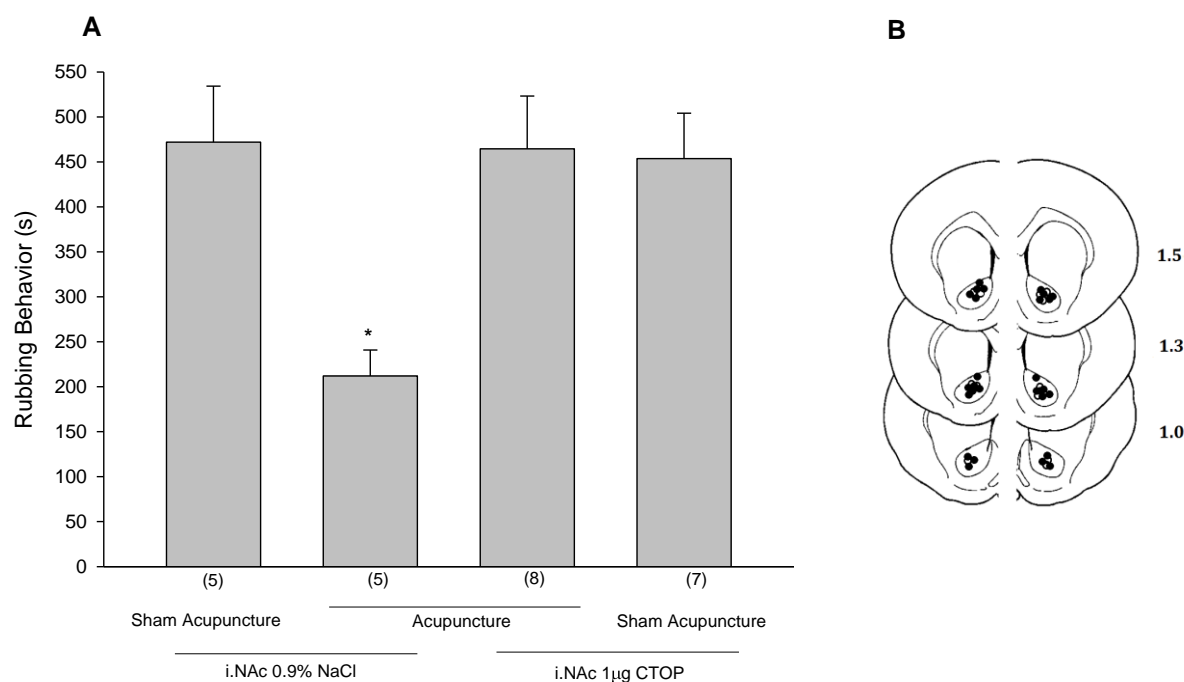


Figure 3 - Pharmacological blockade of μ -opioid receptors located in nucleus accumbens blocked acupuncture-induced antinociception. (A) The microinjection of the μ -opioid receptor antagonist CTOP intra-nucleus accumbens (i.NAc), at a dose known to block ANC-induced antinociception, prevented the antinociceptive effect of acupuncture on orofacial formalin test. The symbol “*” indicates a nociceptive behavior significantly lower than that of the other groups. There is a statistically significant interaction between acupuncture and CTOP treatment (Two Way ANOVA, Tukey's test, $F = 7.33$, $p = 0.013$). **(B)** Nucleus accumbens injection sites plotted on drawings adapted from the atlas of (PAXINOS;WATSON, 2007). Numbers represent distance caudal from bregma. Some symbols overlap others. Closed circles, group that received CTOP; open circles, group that received 0.9% NaCl.

Acupuncture-induced antinociception is prevented by a procedure known to block ascending nociceptive control at rostral ventral medulla level

To evaluate whether the blockade of ANC at RVM level affect acupuncture-induced antinociception we evaluated the ability of intra-RVM administration of mecamlamine, at a dose known to block ANC-induced antinociception, to decrease acupuncture-induced antinociception. As show in Figure 4A, the antinociceptive effect of acupuncture at ST36 on orofacial formalin test was prevented by intra-RVM administration (prior to acupuncture) of the nicotinic acetylcholine receptor antagonist, mecamlamine (0.6 μ g). There is a statistically significant interaction between acupuncture and mecamlamine treatment, Two-way ANOVA and Tukey's test ($F = 6.07$, $p = 0.03$, Figure 4A). Correct RVM injection sites are shown in Figure 4B. This finding demonstrated that, as well as ANC- induced analgesia, acupuncture-induced analgesia depends on nicotinic cholinergic mechanisms on RVM, supporting the idea that activation of ANC mediates acupuncture-induced analgesia.

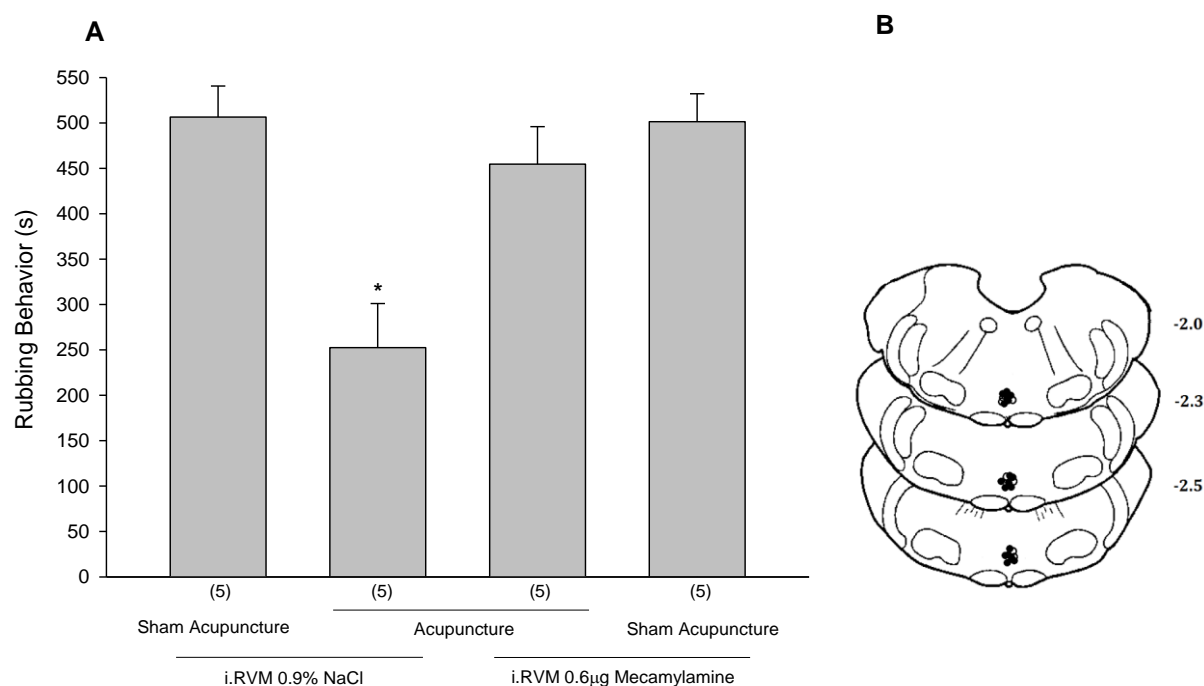


Figure 4 Pharmacological blockade of nicotinic acetylcholine receptors located in rostral ventral medulla blocked acupuncture-induced antinociception. (A) The microinjection of the nicotinic acetylcholine receptor antagonist mecamlamine intra-rostral ventral medulla (i.RVM), at a dose known to block ANC-induced antinociception, prevented the antinociceptive effect of acupuncture on orofacial formalin test. The symbol “*” indicates a nociceptive behavior significantly lower than that of the other groups. There is a statistically significant interaction between acupuncture and mecamlamine treatment (Two Way ANOVA, Tukey's test, $F = 6.07$, $p = 0.03$). **(B)** RVM injection sites plotted on drawings adapted from the atlas of (PAXINOS;WATSON, 2007). Numbers represent distance caudal to the intra-aural line. Some symbols overlap others. Closed circles, group that received mecamlamine; open circles, group that received 0.9% NaCl.

Discussion

In this study we demonstrated for the first time that the analgesia induced by acupuncture is mediated by the activation of ANC, a novel spino-striato-RVM pain modulation pathway. The major evidences that support this idea are that the pharmacological blockade of ANC at spinal, nucleus accumbens and RVM levels prevented acupuncture-induced analgesia.

Although ancient, acupuncture came into scientific focus in the last three decades, when numerous experimental and clinical studies have demonstrated its effectiveness in reducing pain in different circumstances (WANG et al., 2008a; WANG et al., 2008b). Here we demonstrated that unilateral manual acupuncture at ST36, an acupoint located in the hindlimb, induce a potent antinociceptive effect in the orofacial formalin test (Figure 1A). The magnitude and time-course of this antinociceptive effect was similar to that induced by noxious stimulation of the hindpaw through an intraplantar injection of capsaicin. The intraplantar injection of capsaicin is a procedure classically used to trigger ANC (GEAR et al., 1999; SCHMIDT et al., 2001; SCHMIDT et al., 2002a; SCHMIDT et al., 2002b; 2003; TAMBELI et al., 2003a; TAMBELI et al., 2003b; GEAR; LEVINE, 2009; TAMBELI et al., 2009; TAMBELI et al., 2012) and known to activate selectively C-fibers (CATERINA et al., 1997). Therefore, peripheral C-fibers stimulation is the first step in the mechanisms to induced heterosegmental antinociception mediated by ANC. Stimulation of C-fibers in the acupoint region is also the first step in the mechanisms to induce analgesia at a site remote from the acupoint (LIU et al., 1990; OKADA et al., 1996; ZHU et al., 2004; KAGITANI et al., 2010). In fact, here we showed that sciatic C-fibers depletion prevented the antinociceptive effect of acupuncture at ST36 on the orofacial region (Figure 1B). While primary afferent nociceptive input is necessary for the initiation of ANC- and acupuncture-mediated analgesia, it is not for the maintenance. The analgesia mediated by acupuncture lasts for hours after needle removal (WANG et al., 2008a), that mediated by ANC also lasts for hours and is prevented but not reversed by peripheral nerve block (GEAR et al., 1999; TAMBELI et al., 2009). The simplest explanation is that once initiated, the mechanisms underlying analgesia undergo centralization, without need for ongoing peripheral input. The similarities in magnitude, time course, and mechanisms for

initiation and maintenance support the idea that the mechanisms of ANC- and acupuncture-induced analgesia are on the same pathway. To provide evidences that ANC activation mediates the antinociceptive effect of acupuncture, we used pharmacological tools to test the ability of procedures known to block ANC, in its different levels, to block acupuncture-induced analgesia.

The first step in the transmission of primary afferent inputs is spinal cord, where sensory information is integrated and processed. The demonstration of spinal mechanisms in acupuncture-induced analgesia dates from the time of the first studies on acupuncture, however, whether neuronal inputs that ascend from spinal cord are important to acupuncture-induced analgesia is not clear (CHEN-YU et al., 1975; SHEN et al., 1978; HA et al., 1981; LIU, 1990; SATO et al., 1991; ROMITA et al., 1997). Clear is, however, the involvement of inhibitory spinal mechanisms in the antinociceptive effect of acupuncture (ZHAO, 2008). ANC-mediated analgesia is also dependent of multiple inhibitory mechanisms in the spinal cord, for example, it is prevented by intrathecal administration of selective μ -opioid and GABA_A receptor antagonists (TAMBELI et al., 2003a). Here we showed that the antinociceptive effect induced by acupuncture at ST36 on the orofacial region is also prevented by intrathecal administration of selective μ -opioid (Figure 2A) and GABA_A (Figure 2B) receptor antagonists, which is in accordance with previous studies using other experimental models (CHEN; HAN, 1992; LI et al., 1993). These findings showing that procedures known to block ANC at spinal level blocked the antinociceptive effect of acupuncture represent the first evidence we provided to suggest that the mechanisms underlying ANC- and acupuncture-induced analgesia are on the same pathway.

Several supraspinal regions have been implicated in acupuncture-induced analgesia, among them is nucleus accumbens (ZHAO, 2008), a major component of the ventral striatum involved in substance abuse and in pain modulation. Nucleus accumbens is also implicated in ANC-mediated antinociception, for example, it is prevented by intra-nucleus accumbens administration of a μ -opioid receptor antagonist. Here we showed that the antinociceptive effect induced by acupuncture at ST36 on the orofacial region is also prevented by intra-nucleus accumbens administration of a μ -opioid receptor antagonist (Figure 3A), which is in accordance with previous studies using other experimental models (JIN et al., 1985; LIU, 1996).

This finding showing that a procedure known to block ANC at the nucleus accumbens level blocked the antinociceptive effect of acupuncture represents the second evidence we provided to suggest that the mechanisms underlying ANC- and acupuncture-induced analgesia are on the same pathway.

A key supraspinal region involved in pain modulation (FIELDS, 2004; HEINRICHER et al., 2009) and in mechanisms underlying acupuncture induced analgesia (TAKESHIGE et al., 1992) is RVM, a brainstem region that includes the nucleus raphe magnus. ANC-mediated analgesia is also dependent on mechanisms in RVM, for example, it is prevented by microinjection of a selective nicotinic acetylcholine receptor antagonist into the RVM region (GEAR; LEVINE, 2009). Here we showed that the antinociceptive effect induced by acupuncture at ST36 on the orofacial region is also prevented by the administration of a selective nicotinic acetylcholine receptor antagonist into the RVM region (Figure 4A), this is the first demonstration of a cholinergic mechanism in RVM mediating acupuncture-induced antinociception. This finding showing that a procedure known to block ANC at the RVM level blocked the antinociceptive effect of acupuncture represents the third evidence we provided to suggest that the mechanisms underlying ANC- and acupuncture-induced analgesia are on the same pathway.

The involvement of RVM on acupuncture analgesia is largely acceptable as a link between brain regions and descending pain modulation system (TAKESHIGE et al., 1992). This system is the most investigated endogenous pain modulation pathway, in which PAG receives inputs from different brain areas and indirectly controls nociceptive transmission in the dorsal horn through the RVM. Although it is possible that ANC represents a hitherto undiscovered element of the PAG–RVM pain modulation system, this system is mediated by endogenous opioids in both PAG and RVM, while ANC is not. In addition, available evidence argues against PAG participation in RVM cholinergic mechanisms (BEHBEHANI, 1982). Therefore, any functional connection between the PAG–RVM pain modulation system and the ANC remains to be established.

Another pain modulation system implicated in acupuncture-induced analgesia is the diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) (BING et al., 1990). The analgesia mediated by DNIC resembles that of ANC since, like ANC, it is produced by noxious stimulation. However, ANC-mediated analgesia lasts for hours and persists long after a local anesthetic blockade at the site of the initiating noxious

stimulus (GEAR et al., 1999; TAMBELI et al., 2009) while DNIC lasts less than 5 min in most studies and is dependent on the duration of the noxious stimulus (LE BARS et al., 1979). DNIC- and ANC-mediated analgesia also differ in that DNIC is mediated in the caudal medulla and does not require brain circuitry rostral to that point (BOUHASSIRA et al., 1995), whereas, in addition to the spinal cord, ANC depends on mechanisms in nucleus accumbens (GEAR; LEVINE, 1995; SCHMIDT et al., 2002b) and in RVM (GEAR et al., 1999; GEAR; LEVINE, 2009). Therefore, the antinociception produced by ANC and that produced by DNIC are likely to result from different mechanisms, suggesting that ANC is a newly identified mechanism underlying acupuncture-induced analgesia.

The analgesia induced by acupuncture is a form of counter-irritation therapy, in which an acute painful stimulus is used to alleviate ongoing pain. In addition to acupuncture, transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS), sauna, moxa, other kinds of thermal therapies and capsaicin has been used to treat pain of diverse etiology. ANC is the mechanism underlying some of these forms of counter-irritation analgesia, such as acupuncture (present findings), heat and capsaicin (GEAR et al., 1999; TAMBELI et al., 2009), but probably not underlying all of them. The biological purpose of a mechanism to induce analgesia in response to noxious stimulation, which could explain mechanistically counter-irritation analgesia, is not clear. However, a recent article by our group suggested a functional role of ANC in defensive behaviors, specifically, it was demonstrated that ANC activation increases dorsal immobility response in rats (TAMBELI et al., 2012). The immobility response occurs during prey–predator confrontations and increases the chances of survival because the predator requires prey struggle to continue the attack (THOMPSON et al., 1981). It reflects an underlying state of fear and, in humans, is induced in the context of life-threatening events (ROCHA-REGO et al., 2009). Therefore, activation of a mechanism that induces analgesia and modulates defensive behaviors in response to a noxious stimulus is of great importance because analgesia may facilitate this type of defensive behavior and increase the chances of survival in life threatening situations.

In summary, this study demonstrated that acupuncture at ST36 induced heterosegmental antinociception on the orofacial formalin test. The magnitude and time-course of this antinociceptive effect was similar to that induced by an intraplantar injection of capsaicin, a procedure classically used to activate ANC. The

analgesia induced by acupuncture at ST36 on the orofacial region was prevented by (a) sciatic C-fibers depletion, by (b) spinal administration of a μ -opioid or GABA_A receptor antagonists, by (c) intra-accumbens administration of a μ -opioid receptor antagonist or by (d) intra-RVM administration of a nicotinic acetylcholine receptor antagonist. Because each one of these procedures also blocks ANC-mediated analgesia, we suggest that ANC mediates the antinociceptive effect of acupuncture.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, nós demonstramos pela primeira vez que a analgesia induzida pela acupuntura é mediada pela ativação do ANC, uma via de modulação de dor recentemente descrita, que ascende da medula espinhal ao núcleo accumbens e RVM. As principais evidências que suportam esta ideia demonstram que o bloqueio farmacológico do ANC ao nível espinhal, núcleo accumbens ou RVM impede a analgesia induzida pela acupuntura.

Analgesia induzida pela acupuntura ou pela ativação do ANC

Embora milenar, a acupuntura entrou em foco científico nas últimas três décadas, quando numerosos estudos experimentais e clínicos demonstraram sua efetividade em reduzir dor em diferentes circunstâncias (WANG et al., 2008a; WANG et al., 2008b). Inicialmente reproduzimos dados que demonstram que a injeção de capsacina na pata, um procedimento classicamente utilizado para ativar o ANC (GEAR et al., 1999; SCHMIDT et al., 2001; SCHMIDT et al., 2002a; SCHMIDT et al., 2002b; 2003; TAMBELI et al., 2003a; TAMBELI et al., 2003b; GEAR;LEVINE, 2009; TAMBELI et al., 2009; TAMBELI et al., 2012), é capaz de induzir antinocicepção heterosegmental em nossas condições experimentais. A injeção intraplantar da menor dose de capsacina (100 µg) capaz de ativar o ANC (GEAR et al., 1999) reduziu significativamente a nocicepção induzida pela injeção de formalina (2.5%) no lábio. Isto sugere que a ativação do ANC, pela injeção de capsacina na pata (GEAR et al., 1999; SCHMIDT et al., 2001; SCHMIDT et al., 2002a; SCHMIDT et al., 2002b; 2003; TAMBELI et al., 2003a; TAMBELI et al., 2003b; GEAR;LEVINE, 2009; TAMBELI et al., 2009; TAMBELI et al., 2012), seja o mecanismo responsável pelo efeito antinociceptivo na região orofacial. O teste de formalina orofacial foi escolhido como modelo experimental por ser classicamente utilizado como modelo animal de nocicepção (RABOISSON; DALLEL, 2004) e por induzir nocicepção em uma região distante de onde os estímulos para ativação do ANC (nociceptivo ou acupuntura) foram aplicados.

Na sequência era necessário demonstrar que a acupuntura é capaz de reduzir a nocicepção induzida pela formalina no lábio e caracterizar esse efeito. Para isso, o acuponto E36 (*Zusanli*) foi escolhido, por ser amplamente utilizado para induzir analgesia (HAN; HO, 2011) e por ser localizado estrategicamente na pata do animal, um local distante daquele de aplicação do estímulo nociceptivo (lábio superior). Essa separação em regiões segmentais distantes é necessária para manter as intervenções espinhais e periféricas, utilizadas para testar o envolvimento da via, longe do circuito neuronal que medeia a resposta nociceptiva. Nós demonstramos que a acupuntura unilateral no E36, induz um potente efeito antinociceptivo no teste de formalina orofacial (Figure 1A). A magnitude e a duração deste efeito antinociceptivo foi semelhante àquela induzida por estimulação nociceptiva através da injeção intraplantar de capsaicina. Durante o teste de formalina orofacial os animais tipicamente apresentam comportamento nociceptivo caracterizado pelo ato de coçar persistentemente a região de injeção no lábio. Essa é uma resposta bifásica constituída por, uma primeira fase de curta duração (3-5 minutos), seguida após um período de pausa, por uma segunda fase prolongada (até 45 minutos) (RABOISSON; DALLEL, 2004). O efeito antinociceptivo da acupuntura (Figure 1A) é pronunciado na primeira fase e durante quase toda a segunda fase do teste de formalina orofacial, assim como foi para o efeito antinociceptivo da capsaicina intraplantar.

A injeção de capsaicina intraplantar além de ativar o ANC, é um procedimento classicamente conhecido por ativar seletivamente fibras-C (CATERINA et al., 1997). Evidências demonstram que a estimulação de fibras-C na região do acuponto (LIU et al., 1990; OKADA et al., 1996; ZHU et al., 2004; KAGITANI et al., 2010) é o primeiro passo para a ativação das vias de modulação de dor que medeiam o efeito analgésico observado em um local distante do acuponto (DU; CHAO, 1976; LIU et al., 1986; BING et al., 1990; TAKESHIGE et al., 1992; MIURA et al., 2007). Estimulação de fibras-C periféricas é também o primeiro passo para induzir os mecanismos de antinocicepção heterosegmental mediados pelo ANC (GEAR et al., 1999; SCHMIDT et al., 2001; SCHMIDT et al., 2002a; SCHMIDT et al., 2002b; 2003; TAMBELI et al., 2003a; TAMBELI et al., 2003b; GEAR; LEVINE, 2009; TAMBELI et al., 2009; TAMBELI et al., 2012). De fato, no presente estudo nós demonstramos que a acupuntura no ponto E36 ativa fibras-C localizadas na região do acuponto para induzir antinocicepção no lábio superior (Figure 1B). A evidência

experimental para sugerir o envolvimento das fibras-C na analgesia induzida pela acupuntura neste estudo é que a aplicação perineural de capsaicina, um procedimento amplamente difundido para a depleção de fibras-C (quimiodenervação) (SZIGETI et al., 2012) impediu a analgesia induzida pela acupuntura. A depleção de fibras-C foi confirmada, após o experimento, pela ausência de comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de capsaicina (1 µg) nos animais previamente tratados com capsaicina perineural no nervo ciático. Portanto, estes resultados demonstram que a antinocicepção induzida pela acupuntura, assim como aquela mediada pelo ANC, é dependente da ativação de fibras-C.

Enquanto as fibras nociceptivas periféricas são necessárias para o início da analgesia mediada pelo ANC e pela acupuntura, esta aferência não é necessária para a manutenção dessa analgesia. A analgesia por acupuntura dura horas após a remoção da agulha (WANG et al., 2008a), aquela mediada pelo ANC também dura horas e é impedida, mas não revertida, por bloqueio do nervo periférico (GEAR et al., 1999; TAMBELI et al., 2009). A explicação mais simples é que, uma vez iniciado, os mecanismos subjacentes a analgesia sofrem centralização, sem necessidade de uma atividade periférica contínua. As semelhanças em magnitude, duração e mecanismos para a iniciação e manutenção suportam a ideia de que os mecanismos de analgesia induzida pelo ANC e pela acupuntura são os mesmos. Para fornecer evidências de que a ativação do ANC medeia o efeito antinociceptivo da acupuntura, usamos ferramentas farmacológicas para testar a capacidade dos processos conhecidos em bloquear o ANC, em seus diferentes níveis, em bloquear a analgesia induzida por acupuntura.

Mecanismos espinhais envolvidos na antinocicepção induzida pela acupuntura

Da periferia, as fibras-C convergem para a medula espinhal, onde a informação sensorial é integrada e processada. As evidências que mostram o envolvimento de mecanismos espinhais na analgesia induzida pela acupuntura remetem aos primeiros estudos sobre o tema. No entanto, se impulsos neuronais excitatórios que ascendem da medula espinhal são importantes para analgesia

induzida pela acupuntura não está claro (CHEN-YU et al., 1975; SHEN et al., 1978; HA et al., 1981; LIU, 1990; SATO et al., 1991; ROMITA et al., 1997). Por outro lado, vários estudos têm consistentemente demonstrado o envolvimento de neuromediadores inibitórios, como opioides (para revisão ver, HAN, 2004) e GABA (POMERANZ;NGUYEN, 1987; LI et al., 1993; SILVA et al., 2011) nos mecanismos espinais envolvidos na analgesia induzida pela acupuntura. Assim como a analgesia induzida pela acupuntura, aquela induzida pelo ANC é mediada por vários mecanismos inibitórios na medula espinhal, por exemplo, a analgesia mediada pelo ANC é bloqueada pela administração intratecal de antagonistas de receptores μ -opioide e GABA_A (TAMBELLI et al., 2003a). No presente estudo nós demonstramos que a acupuntura no ponto E36 induz antinocicepção no lábio ativando mecanismos espinais dependentes de receptores μ -opioides (Figure 2A) e receptores GABA_A (Figure 2B). Estes resultados mostram que os procedimentos conhecidos por bloquear o ANC ao nível espinhal bloquearam o efeito antinociceptivo da acupuntura e representam a primeira evidência experimental na qual nós nos baseamos para sugerir que os mecanismos que medeiam a analgesia induzida pela acupuntura e pelo o ANC são os mesmos.

Envolvimento do núcleo accumbens na antinocicepção induzida pela acupuntura

Várias regiões supra-espinhais têm sido implicadas na analgesia induzida pela acupuntura, dentre elas está o núcleo accumbens (ZHAO, 2008), um componente importante do estriado ventral que está relacionado com mecanismos de abuso de substâncias e também na modulação da dor. Assim como a acupuntura, a analgesia induzida pelo ANC também depende de mecanismos no núcleo accumbens, por exemplo, a analgesia mediada pelo ANC é impedida pela administração intra-núcleo accumbens de antagonista seletivo para receptor μ -opioide (GEAR et al., 1999; SCHMIDT et al., 2002b). No presente estudo nós demonstramos que a acupuntura no ponto E36 induz antinocicepção orofacial mediada por um mecanismo dependente de μ -opioide no núcleo accumbens (Figure

3A), o que está de acordo com estudos anteriores usando outros modelos experimentais (JIN et al., 1985; LIU, 1996). Estes resultados mostram que os procedimentos conhecidos por bloquear o ANC ao nível do núcleo accumbens bloquearam o efeito antinociceptivo da acupuntura e representam a segunda evidência experimental na qual nós nos baseamos para sugerir que os mecanismos que medeiam a analgesia induzida pela acupuntura e pelo o ANC são os mesmos.

Envolvimento do RVM na antinociceção induzida pela acupuntura

Uma região supra-espinhal chave envolvida na modulação da dor (FIELDS, 2004; HEINRICHER et al., 2009) e em mecanismos envolvidos na analgesia induzida pela acupuntura (TAKESHIGE et al., 1992) é o RVM, uma região do tronco encefálico que inclui o núcleo magno da rafe e formação reticular adjacente. Assim como a acupuntura, analgesia mediada pelo ANC também depende de mecanismos no RVM, por exemplo, a analgesia mediada pelo ANC é impedida por microinjeção intra-RVM de um antagonista seletivo de receptores nicotínicos de acetilcolina (GEAR; LEVINE, 2009). No presente estudo nós demonstramos que a acupuntura no ponto E36 induz antinociceção orofacial por um mecanismo colinérgico nicotínico no RVM (Figure 4A), esta é a primeira demonstração de um mecanismo colinérgico no RVM mediando antinociceção induzida pela acupuntura. Estes resultados mostram que os procedimentos conhecidos por bloquear o ANC ao nível do RVM bloquearam o efeito antinociceptivo da acupuntura e representam a terceira evidência experimental na qual nós nos baseamos para sugerir que os mecanismos que medeiam a analgesia induzida pela acupuntura e pelo o ANC são os mesmos.

Outros mecanismos

O envolvimento do RVM na analgesia induzida pela acupuntura é amplamente aceitável, mas apenas como uma região de ligação entre outras regiões do cérebro e o sistema de modulação de dor descendente (TAKESHIGE et al.,

1992). Este sistema é a via de modulação endógena mais investigada em dor, onde a PAG recebe aferências de diferentes áreas do cérebro e indiretamente controla a transmissão da dor no corno dorsal através do RVM. Embora seja possível que o ANC represente um elemento até então desconhecido do sistema de modulação de dor PAG–RVM, este sistema é mediado por opioides endógenos na PAG e RVM, enquanto ANC não (GEAR; LEVINE, 1995). Embora o RVM receba conexões da PAG, as evidências são contrárias a uma participação da PAG em mecanismos colinérgicos do RVM (BEHBEHANI, 1982). Portanto, qualquer conexão funcional entre o sistema de modulação de dor PAG–RVM e o ANC permanece por ser estabelecida (GEAR; LEVINE, 2009).

Outro sistema de modulação de dor que já fora associado a analgesia induzida pela acupuntura é o DNIC (BING et al., 1990), o qual medeia analgesia semelhante daquela promovida pelo ANC, pois assim como o ANC, é produzida por estimulação nociva. No entanto, a analgesia induzida pelo ANC tem duração de até 2,5 horas e persiste muito tempo mesmo após o bloqueio com anestésico local na região do estímulo nocivo inicial (GEAR et al., 1999; TAMBELI et al., 2009) enquanto a analgesia produzida pelo DNIC tem duração menor que 5 (cinco) minutos na maioria dos estudos e é dependente da duração do estímulo nocivo (LE BARS et al., 1979). Além disso, a analgesia mediada pelo DNIC e pelo ANC também difere, pois o DNIC é principalmente um sistema espinhal e requer circuitos cerebrais rostrais ao bulbo caudal (BOUHASSIRA et al., 1995), enquanto que além da medula espinhal, o ANC depende de mecanismos no núcleo accumbens (GEAR; LEVINE, 1995; SCHMIDT et al., 2002b) e no RVM (GEAR et al., 1999; GEAR; LEVINE, 2009).

Papel fisiológico do ANC

A analgesia induzida pela acupuntura é uma forma de terapia por contra-irritação (do inglês, *counter-irritation*), no qual um estímulo doloroso agudo é usado para aliviar uma dor contínua. Outras terapias por contra-irritação como, estimulação elétrica transcutânea (TENS), sauna, moxa, outras terapias por calor e capsaicina vêm sendo utilizadas para tratar dor de diversas etiologias. O ANC é provavelmente o mecanismo envolvido em algumas destas formas de analgesia por contra-irritação

como, acupuntura (mostrada no presente trabalho), capsaicina e calor (GEAR et al., 1999; TAMBELI et al., 2009) mas provavelmente não é o mecanismo para todas elas. A finalidade biológica de um mecanismo para induzir analgesia em resposta à estimulação nociva, o que poderia explicar mecanicamente a analgesia por contra-irritação, não é clara. No entanto, um recente artigo de nosso grupo sugeriu um papel funcional ao ANC em comportamentos defensivos, especificamente, foi demonstrado que a ativação do ANC aumenta a resposta de imobilidade dorsal em ratos (TAMBELI et al., 2012). A resposta de imobilidade ocorre durante os confrontos entre presa-predador e aumenta as chances de sobrevivência da presa, uma vez que o debater da presa parece ser necessário para que o predador continue o ataque (THOMPSON et al., 1981). O comportamento de imobilidade reflete um estado subjacente do medo e, nos seres humanos, é induzido no contexto de risco de morte ao sujeito (ROCHA-REGO et al., 2009). Portanto, a ativação de um mecanismo que induza analgesia e module comportamentos defensivos, em resposta a um estímulo nocivo, é de grande importância porque, a analgesia pode facilitar este tipo de comportamento defensivo e aumentar as chances de sobrevivência em situações de risco de morte.

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a acupuntura no ponto E36 induziu antinocicepção heterosegmental no teste de formalina orofacial. A magnitude e a duração deste efeito antinociceptivo foi similar àquela induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, um procedimento classicamente utilizado para ativar o ANC. A analgesia na região orofacial induzida pela acupuntura no ponto E36 foi prevenida pela (a) depleção de fibras-C no nervo ciático, pela (b) administração espinal de antagonistas de receptores μ -opioide ou GABA_A, pela (c) administração intra-núcleo accumbens de antagonista de receptor μ -opioide ou pela (d) administração intra-RVM de antagonista de receptor colinérgico nicotínico. Estes procedimentos são os mesmos que bloqueiam a analgesia mediada pela ativação do ANC, assim, nós sugerimos que o ANC medeia o efeito antinociceptivo da acupuntura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAI, B.;WANG, H.;LIU, W. Y.;SONG, C. Y. Effect of anti-opioid peptide sera on the enhancement of electroacupuncture analgesia induced by neurotensin in PAG of rats. **Sheng Li Xue Bao**, v.51, n.2, Apr, p.224-8. 1999.

BASBAUM, A. I.;BAUTISTA, D. M.;SCHERRER, G.;JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, n.2, Oct 16, p.267-84. 2009.

BEHBEHANI, M. M. The role of acetylcholine in the function of the nucleus raphe magnus and in the interaction of this nucleus with the periaqueductal gray. **Brain Res**, v.252, n.2, Dec 9, p.299-307. 1982.

BING, Z.;VILLANUEVA, L.;LE BARS, D. Acupuncture and diffuse noxious inhibitory controls: naloxone-reversible depression of activities of trigeminal convergent neurons. **Neuroscience**, v.37, n.3, p.809-18. 1990.

BOUHASSIRA, D.;CHITOUR, D.;VILLANEUVA, L.;LE BARS, D. The spinal transmission of nociceptive information: modulation by the caudal medulla. **Neuroscience**, v.69, n.3, Dec, p.931-8. 1995.

CATERINA, M. J.;SCHUMACHER, M. A.;TOMINAGA, M.;ROSEN, T. A.;LEVINE, J. D.;JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, n.6653, Oct 23, p.816-24. 1997.

CHEN-YU, C.;JEN-YI, L.;TEH-HSING, C.;YAO-HUI, P.;SHU-CHIEH, C. Studies on spinal ascending pathway for effect of acupuncture analgesia in rabbits. **Sci Sin**, v.18, n.5, Sep-Oct, p.651-8. 1975.

CHEN, X. H.;HAN, J. S. All three types of opioid receptors in the spinal cord are important for 2/15 Hz electroacupuncture analgesia. **Eur J Pharmacol**, v.211, n.2, Feb 11, p.203-10. 1992.

DU, H. J.;CHAO, Y. F. Localization of central structures involved in descending inhibitory effect of acupuncture on visceros-somatic reflex discharges. **Sci Sin**, v.19, n.1, Jan-Feb, p.137-48. 1976.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nat Rev Neurosci**, v.5, n.7, Jul, p.565-75. 2004.

GEAR, R. W.;ALEY, K. O.;LEVINE, J. D. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. **J Neurosci**, v.19, n.16, Aug 15, p.7175-81. 1999.

GEAR, R. W.;LEVINE, J. D. Antinociception produced by an ascending spino-supraspinal pathway. **J Neurosci**, v.15, n.4, Apr, p.3154-61. 1995.

GEAR, R. W.;LEVINE, J. D. Rostral ventral medulla cholinergic mechanism in pain-induced analgesia. **Neurosci Lett**, v.464, n.3, Oct 30, p.170-2. 2009.

- GEAR, R. W.;LEVINE, J. D. Nucleus accumbens facilitates nociception. **Exp Neurol**, v.229, n.2, Jun, p.502-6. 2011.
- GILCHRIST, H. D.;ALLARD, B. L.;SIMONE, D. A. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. **Pain**, v.67, n.1, Sep, p.179-88. 1996.
- HA, H.;TAN, E. C.;FUKUNAGA, H.;AOCHI, O. Naloxone reversal of acupuncture analgesia in the monkey. **Exp Neurol**, v.73, n.1, Jul, p.298-303. 1981.
- HAN, J. S. Acupuncture and endorphins. **Neurosci Lett**, v.361, n.1-3, May 6, p.258-61. 2004.
- HAN, J. S. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. **Pain**, v.152, n.3 Suppl, Mar, p.S41-8. 2011.
- HAN, J. S.;HO, Y. S. Global trends and performances of acupuncture research. **Neurosci Biobehav Rev**, v.35, n.3, Jan, p.680-7. 2011.
- HEINRICHER, M. M.;TAVARES, I.;LEITH, J. L.;LUMB, B. M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev**, v.60, n.1, Apr, p.214-25. 2009.
- HOLMES, B. B.;FUJIMOTO, J. M. 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**, v.261, n.1, Apr, p.146-53. 1992.
- JIN, W. Q.;ZHOU, Z. F.;HAN, J. S. Inhibition of enkephalins degradation in the nucleus accumbens leads to potentiation of acupuncture and morphine analgesia. **Sheng Li Xue Bao**, v.37, n.4, Aug, p.377-82. 1985.
- JULIUS, D.;BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.
- KAGITANI, F.;UCHIDA, S.;HOTTA, H. Afferent nerve fibers and acupuncture. **Auton Neurosci**, v.157, n.1-2, Oct 28, p.2-8. 2010.
- KIM, J. H.;MIN, B. I.;SCHMIDT, D.;LEE, H. J.;PARK, D. S. The difference between electroacupuncture only and electroacupuncture with manipulation on analgesia in rats. **Neurosci Lett**, v.279, n.3, Feb 4, p.149-52. 2000.
- LE BARS, D.;DICKENSON, A. H.;BESSON, J. M. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. **Pain**, v.6, n.3, Jun, p.283-304. 1979.
- LE BARS, D.;GOZARIU, M.;CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v.53, n.4, Dec, p.597-652. 2001.

LE BARS, D.;VILLANUEVA, L. Electrophysiological evidence for the activation of descending inhibitory controls by nociceptive afferent pathways. **Prog Brain Res**, v.77, p.275-99. 1988.

LE BARS, D.;VILLANUEVA, L.;BOUHASSIRA, D.;WILLER, J. C. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man. **Patol Fiziol Eksp Ter**, n.4, Jul-Aug, p.55-65. 1992.

LI, A. H.;ZHANG, J. M.;XIE, Y. K. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin-nerve complexes with enriched nerve endings. **Brain Res**, v.1012, n.1-2, Jun 25, p.154-9. 2004.

LI, C.;ZHU, L.;LI, W.;JI, C. Relationship between the presynaptic depolarization effect of acupuncture and r-aminobutyric acid, opioid peptide and substance P. **Zhen Ci Yan Jiu**, v.18, n.3, p.178-82. 1993.

LIU, W.;BAI, B.;SONG, C.;WANG, S.;SHI, W. The role of periaqueductal gray neurotensin in electroacupuncture analgesia. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, v.13, n.3, Aug, p.253-6. 1997.

LIU, X. The role of negative feedback modulating pain of nucleus raphe magnus in electroacupuncture analgesia. **Zhen Ci Yan Jiu**, v.15, n.3, p.159-66. 1990.

LIU, X. The modulation of cerebral cortex and subcortical nuclei on NRM and their role in acupuncture analgesia. **Zhen Ci Yan Jiu**, v.21, n.1, p.4-11. 1996.

LIU, X.;ZHU, B.;ZHANG, S. X. Relationship between electroacupuncture analgesia and descending pain inhibitory mechanism of nucleus raphe magnus. **Pain**, v.24, n.3, Mar, p.383-96. 1986.

LIU, X. A.;JIANG, M. C.;HUANG, P. B.;ZOU, T. Role of afferent C fibers in electroacupuncture of "zusanli" point in activating nucleus raphe magnus. **Sheng Li Xue Bao**, v.42, n.6, Dec, p.523-33. 1990.

LUX, F.;WELCH, S. P.;BRASE, D. A.;DEWEY, W. L. 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**, v.246, n.2, Aug, p.500-7. 1988.

MERSKEY, H.;BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms**. Seattle: IASP Press. 1994. 209-214 p. (Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage)

MIASKOWSKI, C.;LEVINE, J. D. Inhibition of spinal opioid analgesia by supraspinal administration of selective opioid antagonists. **Brain Res**, v.596, n.1-2, Nov 20, p.41-5. 1992.

MIURA, K.;OHARA, T.;ZEREDO, J. L.;OKADA, Y.;TODA, K.;SUMIKAWA, K. Effects of traditional "Juci" (contralateral acupuncture) on orofacial nociceptive behavior in the rat. **J Anesth**, v.21, n.1, p.31-6. 2007.

MURASE, K.;KAWAKITA, K. Diffuse noxious inhibitory controls in anti-nociception produced by acupuncture and moxibustion on trigeminal caudalis neurons in rats. **Jpn J Physiol**, v.50, n.1, Feb, p.133-40. 2000.

OKADA, K.;OSHIMA, M.;KAWAKITA, K. Examination of the afferent fiber responsible for the suppression of jaw-opening reflex in heat, cold, and manual acupuncture stimulation in rats. **Brain Res**, v.740, n.1-2, Nov 18, p.201-7. 1996.

PAPIR-KRICHELI, D.;FREY, J.;LAUFER, R.;GILON, C.;CHOREV, M.;SELINGER, Z.;DEVOR, M. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. **Pain**, v.31, n.2, Nov, p.263-76. 1987.

PAXINOS, G.;WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. New York: Academic Press. 2007. 456 p.

POMERANZ, B.;NGUYEN, P. Intrathecal diazepam suppresses nociceptive reflexes and potentiates electroacupuncture effects in pentobarbital-anesthetized rats. **Neurosci Lett**, v.77, n.3, Jun 26, p.316-20. 1987.

RABOISSON, P.;DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neurosci Biobehav Rev**, v.28, n.2, Apr, p.219-26. 2004.

ROCHA-REGO, V.;FISZMAN, A.;PORTUGAL, L. C.;GARCIA PEREIRA, M.;DE OLIVEIRA, L.;MENDLOWICZ, M. V.;MARQUES-PORTELLA, C.;BERGER, W.;FREIRE COUTINHO, E. S.;MARI, J. J.;FIGUEIRA, I.;VOLCHAN, E. Is tonic immobility the core sign among conventional peritraumatic signs and symptoms listed for PTSD? **J Affect Disord**, v.115, n.1-2, May, p.269-73. 2009.

ROMITA, V. V.;YASHPAL, K.;HUI-CHAN, C. W.;HENRY, J. L. Intense peripheral electrical stimulation evokes brief and persistent inhibition of the nociceptive tail withdrawal reflex in the rat. **Brain Res**, v.761, n.2, Jul 4, p.192-202. 1997.

SATO, T.;TAKESHIGE, C.;SHIMIZU, S. Morphine analgesia mediated by activation of the acupuncture-analgesia-producing system. **Acupunct Electrother Res**, v.16, n.1-2, p.13-26. 1991.

SCHMIDT, B. L.;TAMBELI, C. H.;BARLETTA, J.;LUO, L.;GREEN, P.;LEVINE, J. D.;GEAR, R. W. Altered nucleus accumbens circuitry mediates pain-induced antinociception in morphine-tolerant rats. **J Neurosci**, v.22, n.15, Aug 1, p.6773-80. 2002a.

SCHMIDT, B. L.;TAMBELI, C. H.;GEAR, R. W.;LEVINE, J. D. Nicotine withdrawal hyperalgesia and opioid-mediated analgesia depend on nicotine receptors in nucleus accumbens. **Neuroscience**, v.106, n.1, p.129-36. 2001.

SCHMIDT, B. L.;TAMBELI, C. H.;LEVINE, J. D.;GEAR, R. W. mu/delta Cooperativity and opposing kappa-opioid effects in nucleus accumbens-mediated antinociception in the rat. **Eur J Neurosci**, v.15, n.5, Mar, p.861-8. 2002b.

SCHMIDT, B. L.;TAMBELI, C. H.;LEVINE, J. D.;GEAR, R. W. Adaptations in nucleus accumbens circuitry during opioid withdrawal associated with persistence of noxious stimulus-induced antinociception in the rat. **J Pain**, v.4, n.3, Apr, p.141-7. 2003.

SHEN, E.;MA, W. H.;LAN, C. Involvement of descending inhibition in the effect of acupuncture on the splanchnically evoked potential in the orbital cortex of cat. **Sci Sin**, v.21, n.5, Sep-Oct, p.677-85. 1978.

SILVA, J. R.;SILVA, M. L.;PRADO, W. A. 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**, v.12, n.1, Jan, p.51-60. 2011.

SZIGETI, C.;SANTHA, P.;KORTVELY, E.;NYARI, T.;HORVATH, V. J.;DEAK, E.;DUX, M.;GULYA, K.;JANCOSO, G. Disparate changes in the expression of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor mRNA and protein in dorsal root ganglion neurons following local capsaicin treatment of the sciatic nerve in the rat. **Neuroscience**, v.201, Jan 10, p.320-30. 2012.

TAKESHIGE, C.;SATO, T.;MERA, T.;HISAMITSU, T.;FANG, J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. **Brain Res Bull**, v.29, n.5, Nov, p.617-34. 1992.

TAMBELI, C. H.;FISCHER, L.;MONALIZA, S. L.;MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.;PARADA, C. A. The functional role of ascending nociceptive control in defensive behavior. **Brain Res**, v.1464, Jun 29, p.24-9. 2012.

TAMBELI, C. H.;LEVINE, J. D.;GEAR, R. W. Centralization of noxious stimulus-induced analgesia (NSIA) is related to activity at inhibitory synapses in the spinal cord. **Pain**, v.143, n.3, Jun, p.228-32. 2009.

TAMBELI, C. H.;PARADA, C. A.;LEVINE, J. D.;GEAR, R. W. Inhibition of tonic spinal glutamatergic activity induces antinociception in the rat. **Eur J Neurosci**, v.16, n.8, Oct, p.1547-53. 2002.

TAMBELI, C. H.;QUANG, P.;LEVINE, J. D.;GEAR, R. W. Contribution of spinal inhibitory receptors in heterosegmental antinociception induced by noxious stimulation. **Eur J Neurosci**, v.18, n.11, Dec, p.2999-3006. 2003a.

TAMBELI, C. H.;YOUNG, A.;LEVINE, J. D.;GEAR, R. W. Contribution of spinal glutamatergic mechanisms in heterosegmental antinociception induced by noxious stimulation. **Pain**, v.106, n.1-2, Nov, p.173-9. 2003b.

THOMPSON, R. K. R.;FOLTIN, R. W.;BOYLAN, R. J.;SWEET, A.;GRAVES, C. A.;LOWITZ, C. E. Tonic immobility in Japanese quail can reduce the probability of sustained attack by cats. **Anim. Learn. Behav.**, v.9, p.145-149. 1981.

VILLANUEVA, L.;BOUHASSIRA, D.;BING, Z.;LE BARS, D. Convergence of heterotopic nociceptive information onto subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla. **J Neurophysiol**, v.60, n.3, Sep, p.980-1009. 1988.

WANG, S. M.;KAIN, Z. N.;WHITE, P. Acupuncture analgesia: I. The scientific basis. **Anesth Analg**, v.106, n.2, Feb, p.602-10. 2008a.

WANG, S. M.;KAIN, Z. N.;WHITE, P. F. Acupuncture analgesia: II. Clinical considerations. **Anesth Analg**, v.106, n.2, Feb, p.611-21, table of contents. 2008b.

WELCH, S. P.;STEVENS, D. L.;DEWEY, W. L. A proposed mechanism of action for the antinociceptive effect of intrathecally administered calcium in the mouse. **J Pharmacol Exp Ther**, v.260, n.1, Jan, p.117-27. 1992.

WOOLF, C. J.;SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, n.5472, Jun 9, p.1765-9. 2000.

ZEILHOFER, H. U. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v.154, p.73-100. 2005.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Prog Neurobiol**, v.85, n.4, Aug, p.355-75. 2008.

ZHU, B.;XU, W. D.;RONG, P. J.;BEN, H.;GAO, X. Y. A C-fiber reflex inhibition induced by electroacupuncture with different intensities applied at homotopic and heterotopic acupoints in rats selectively destructive effects on myelinated and unmyelinated afferent fibers. **Brain Res**, v.1011, n.2, Jun 18, p.228-37. 2004.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, Jun, p.109-10. 1983.