

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GLAUCIA TOBALDINI

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



CURITIBA

2017

GLAUCIA TOBALDINI

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

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Luana Fischer.

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Obrigada às minhas colegas de apartamento (ou agregadas) e irmãs da vida, Andressa, Claudia, Dabna, Adriana, Priscilla e Fabíola – a Fisiologia nos uniu para sempre.

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

Às minhas amigas da vida, que são as melhores! Daniele, Tatiana, Elizandra, Fernanda e Keila. Obrigada mesmo.

Aos meus colegas de laboratório Vinícius, Rafael, Mayla, Priscila, Thaina, Erick e Jhuliana, muito obrigada pelos tantos momentos juntos.

Aos amigos e professores do laboratório de Neurofisiologia, muito obrigada.

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

RESUMO

1
2
3
4 A via de modulação mais importante e amplamente conhecida é o sistema
5 descendente PAG-RVM (substância cinzenta periaquedutal – bulbo rostro
6 ventromedial). Neste estudo, nós hipotetizamos que este sistema está
7 funcionalmente ligado ao controle nociceptivo ascendente, uma forma de analgesia
8 induzida por dor, dependente de mecanismos mesolímbicos. Para testar esta
9 hipótese, usamos uma abordagem farmacológica, na qual a antinocicepção induzida
10 por estimulação nociceptiva (injeção de capsaicina na pata dianteira) foi detectada
11 em um modelo de dor inflamatória (injeção de carragenina na pata traseira). Esta
12 antinocicepção foi bloqueada por intervenções reconhecidas por bloquearem a
13 analgesia mediada pelo controle nociceptivo ascendente: o bloqueio dos receptores
14 μ -opioide (CTOP, 0,5 μ g) ou dos receptores D₁ e D₂ de dopamina (SCH23390, 1,8
15 μ g e raclopride, 5 μ g) intra-NAc bem como o bloqueio dos receptores nicotínicos de
16 acetilcolina (mecamilamina, 0,6 μ g) intra-RVM. Esta antinocicepção também foi
17 bloqueada por intervenções reconhecidas por bloquearem os mecanismos
18 descendentes inibitórios tanto intra-PAG quanto intra-RVM: bloqueio neuronal local
19 agudo (lidocaína, 2%); bloqueio dos receptores μ -opioide (CTOP, 0,5 μ g) ou
20 ativação dos receptores GABA_A (muscimol, 10 ng). De forma consistente, a
21 antinocicepção foi bloqueada de forma semelhante por intervenções reconhecidas
22 pelo bloqueio de mecanismos espinhais de inibição descendente: lesão do funículo
23 dorsolateral e bloqueio espinhal dos receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} (WAY100135,
24 46 μ g) e 5HT₃ (tropisetron, 10 μ g); ou de receptores α 2-adrenérgicos (idazoxan, 50
25 μ g). A atividade neuronal, indiretamente estimada pela expressão de c-Fos, no NAc,
26 PAG e RVM correlaciona-se bem com as observações comportamentais. Portanto,
27 este estudo fornece evidências funcionais para argumentar que a estimulação
28 nociceptiva ativa uma via de modulação da dor ascendente-descendente que liga o
29 sistema mesolímbico ao sistema descendente PAG-RVM.
30

31 **Palavras-chave:** modulação da dor; controle nociceptivo ascendente; sistema
32 descendente substância cinzenta periaquedutal-bulbo rostro ventromedial; sistema
33 mesolímbico; núcleo accumbens; PAG; RVM; medula espinhal; opioide; dopamina;
34 estimulação nociceptiva; comportamento; rato.
35

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

1		
2		
3		
4	FIGURA I - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS CIRCUITOS DE	
5	MODULAÇÃO DA DOR..	13
6	FIGURA II - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISTRIBUIÇÃO SINÁPTICA	
7	DE RECEPTORES OPIOIDES NAS CÉLULAS “ON” E “OFF” DO RVM E SUAS	
8	PROJEÇÕES PARA A MEDULA ESPINHAL.....	14
9		
10	FIGURE 1. EXPERIMENTAL DESIGN.	34
11	FIGURE 2. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION ON CARRAGEENAN-	
12	INDUCED HYPERALGESIA DEPENDS ON μ-OPIOID AND DOPAMINE	
13	RECEPTORS WITHIN NAC AND NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS	
14	WITHIN RVM.....	41
15	FIGURE 3. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION ON CARRAGEENAN-	
16	INDUCED HYPERALGESIA DEPENDS ON ACTIVATION OF μ-OPIOID	
17	RECEPTORS AND INHIBITION OF GABA_A RECEPTORS LOCATED ON PAG AND	
18	RVM.	44
19	FIGURE 4. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION ON CARRAGEENAN-	
20	INDUCED HYPERALGESIA DEPENDS ON THE INTEGRITY OF THE	
21	DORSOLATERAL FUNICULUS.....	45
22	FIGURE 5. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION ON CARRAGEENAN-	
23	INDUCED HYPERALGESIA DEPENDS ON SPINAL SEROTONERGIC AND	
24	ADRENERGIC BUT NOT DOPAMINE RECEPTORS..	48
25	FIGURE 6. C-FOS EXPRESSION IN THE NAC, PAG AND RVM.	50
26		
27	SUPPLEMENTARY FIGURE S1. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION IS	
28	SIMILAR TO SYSTEMIC MORPHINE-INDUCED ANTINOCICEPTION..	51
29	SUPPLEMENTARY FIGURE S2. CONTROL GROUPS – BY THEMSELVES THE	
30	EXPERIMENTAL MANIPULATIONS DID NOT AFFECT CARRAGEENAN-INDUCED	
31	HYPERALGESIA.....	52
32	SUPPLEMENTARY FIGURE S3. CAPSAICIN-INDUCED ANTINOCICEPTION IS	
33	SIMILAR TO INTRA-PAG DAMGO-INDUCED ANTINOCICEPTION.....	53
34	SUPPLEMENTARY FIGURE S4. MICROINJECTION SITES..	54
35		
36	SUPPLEMENTARY TABLE 1. EFFECT (MEAN \pm S.E.M.) OF EXPERIMENTAL	
37	MANIPULATIONS ON LOCOMOTOR ACTIVITY IN THE OPEN FIELD TEST..	55
38		
39		

APRESENTAÇÃO

1
2
3
4
5
6
7
8

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

SUMÁRIO

1		
2		
3		
4	1	INTRODUÇÃO10
5	2	MECANISMOS ENDÓGENOS DE MODULAÇÃO DA DOR12
6	3	RELAÇÃO ENTRE O CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE E O
7		SISTEMA DESCENDENTE PAG-RVM17
8	4	OBJETIVOS18
9	4.1	OBJETIVO GERAL18
10	4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS18
11	5	MÉTODOS20
12		ANIMAIS UTILIZADOS20
13		DROGAS UTILIZADAS20
14		PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS21
15		CIRURGIA ESTEREOTÁXICA21
16		LESÃO DO FUNÍCULO DORSOLATERAL21
17		MODELO COMPORTAMENTAL - PARA ESTUDAR A ANALGESIA MEDIADA PELO
18		CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE22
19		INJEÇÕES DE DROGAS22
20		<i>Injeções na pata22</i>
21		<i>Microinjeções intracérebro23</i>
22		<i>Injeção intratecal23</i>
23		TESTES COMPORTAMENTAIS24
24		<i>Teste mecânico de retirada de pata24</i>
25		<i>Teste do campo aberto24</i>
26		C-FOS IMUNOHISTOQUÍMICA24
27		ANÁLISE ESTATÍSTICA25
28	6	ARTIGO CIENTÍFICO26
29	7	DISCUSSÃO61
30	8	CONCLUSÃO66
31	9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS67
32		
33		
34		

1 INTRODUÇÃO

2

3

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

10 Com isso, podemos diferenciar **nocicepção** de **dor**, sendo que **nocicepção**
11 refere-se aos mecanismos neurofisiológicos gerados pelo estímulo nocivo, isto é, o
12 produto da estimulação das fibras nociceptivas aferentes primárias através de
13 estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos (Basbaum et al., 2009).
14 Enquanto **dor** envolve a percepção destes componentes fisiológicos (sensoriais) e
15 da integração com componentes emocionais (Basbaum et al., 2009). Em modelos
16 animais, a dor pode ser avaliada indiretamente, através da observação do
17 comportamento frente ao estímulo nociceptivo (Le Bars et al., 2001).

18 A **dor aguda**, por sua natureza aversiva inerente, tem a capacidade de
19 prender a atenção e dominar o comportamento do indivíduo, apresentando então,
20 um caráter essencial à sobrevivência. Por conta disso, a habilidade em suprimir a
21 percepção da dor também pode ser fundamental para a sobrevivência durante
22 situações de ameaça. Cabe aos mecanismos neurais modular tais respostas, o que,
23 ao longo da evolução das espécies, vem sendo feito com grande sucesso (Burrell,
24 2017). Com efeito, mecanismos endógenos de modulação da dor favorecem o
25 indivíduo a se envolver em respostas ambientais de sobrevivência ou em
26 comportamentos curativos, de acordo com que for mais vantajoso. Isto é, se escapar
27 de uma situação de perigo for mais interessante, a dor é suprimida, mas não será se
28 a extensão da lesão exigir comportamento recuperativos, por exemplo (Porreca &
29 Navratilova, 2017).

30 A compreensão dos **mecanismos** pelos quais o cérebro controla a
31 percepção da dor aguda pode permitir sua manipulação para controlar a **dor**
32 **persistente e crônica**. De fato, alterações no funcionamento de tais mecanismos é
33 uma das causas de dor crônica - o tipo patológico de dor que causa sofrimento e é
34 desprovido de propósito biológico. Na verdade, várias drogas para o gerenciamento

1 da dor agem em mecanismos endógenos de modulação da dor (Ossipov et al.,
2 2010), no entanto, ainda estamos longe de tratar eficientemente a dor. Além do
3 mais, o manejo inapropriado da dor pelos sistemas de saúde envolve um enorme
4 custo aos governos e aos próprios pacientes, e prejuízos à qualidade de vida destes
5 indivíduos (Gaskin & Richard, 2012; Katz, 2002; McCarberg et al., 2008).

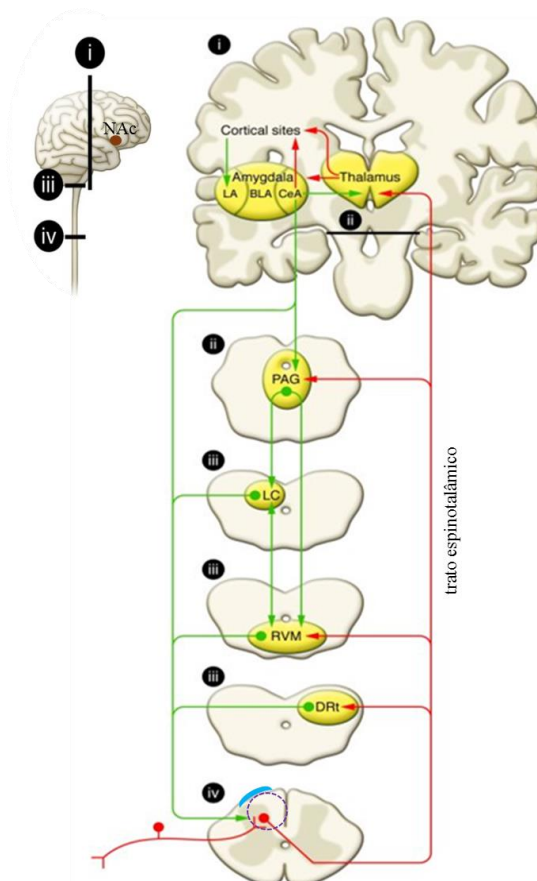
2 MECANISMOS ENDÓGENOS DE MODULAÇÃO DA DOR

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

O RVM possui a capacidade de modular de forma inibitória ou facilitatória a informação nociceptiva no corno dorsal, isto é, pode ter papel anti-nociceptivo ou pró-nociceptivo de acordo com o balanço final das eferências (Millan, 2002). De fato, a excitação ou a administração de opioides nestes núcleos promove antinocicepção, enquanto a administração de agonista GABA_A tem papel pró-nociceptivo. Embora paradoxal, isto ocorre devido um complexo mecanismo celular de interneurônios na PAG e no RVM, no qual interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos localizados na PAG, inibem neurônios de projeção no RVM (células “Off” – inibitórias ou antinociceptivas), enquanto outro grupo de células no RVM (células “On” – facilitatórias ou pró-nociceptivas) mantém sua atividade (Fields, 2004). Acredita-se que os opioides ajam em receptores localizados nos interneurônios GABA e nas células “On”, assim ao inibir tais interneurônios ocorre desinibição das células “Off” e

1 ao mesmo tempo inibição das células “On”, o que resulta em analgesia (Fields,
2 2004). Este circuito está ilustrado na Figura II.

3



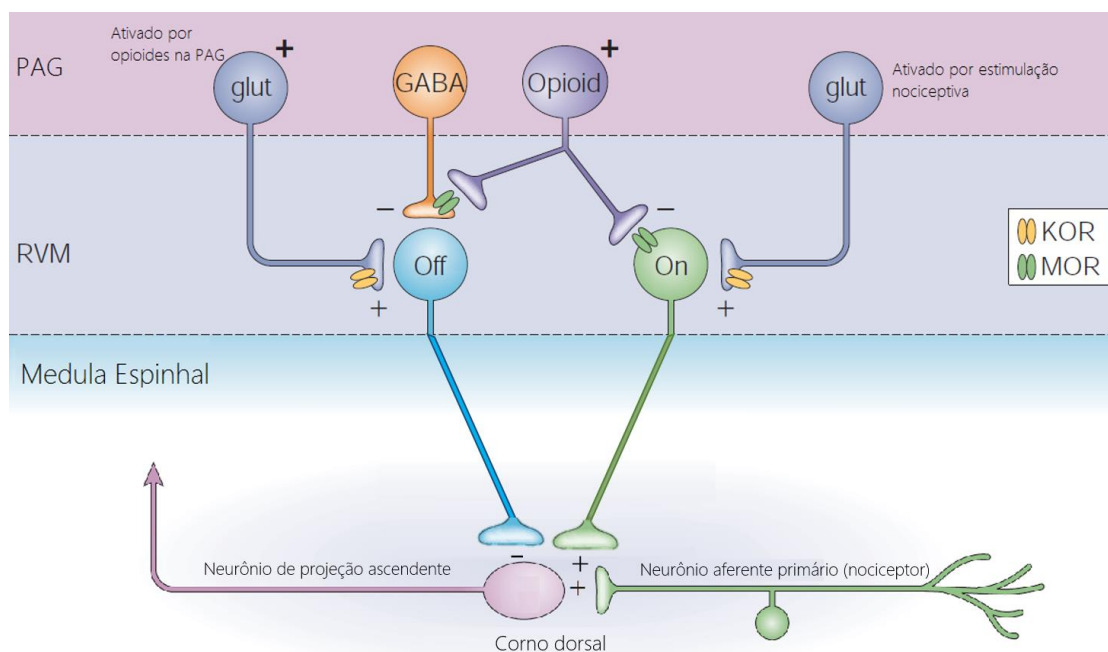
4

5 **Figura I - Representação esquemática dos circuitos de modulação da dor.** As entradas
6 nociceptivas (em vermelho) entram no corno dorsal da medula espinhal (círculo pontilhado em roxo) e
7 ascendem anterolateral através do trato espinotalâmico. Tais projeções chegam ao tálamo, enquanto
8 as colaterais visam o DRt (subnúcleo reticular dorsal), o RVM (bulbo rostro ventromedial) e a PAG
9 (substância cinzenta periaquedutal) - projeções descendentes a partir do DRt são essenciais à
10 analgesia do DNIC. O tálamo por sua vez projeta para regiões corticais e para a amígdala. A
11 modulação descendente (em verde) se dá através de projeções à PAG que projeta ao RVM de onde
12 partem as projeções para a medula espinhal (através do funículo dorsolateral, representado em azul).
13 Além disso, o locus coeruleus (LC) recebe projeções da PAG, se comunica com o RVM e envia
14 projeções noradrenérgicas inibitórias ao corno dorsal. Em marrom está ilustrado a orientação do NAc
15 (núcleo accumbens). Figura adaptada de Ossipov et al. (2010).
16

17 Mais recente, a partir da década de 90, é o estudo de um sistema
18 ascendente de modulação da dor. Observações iniciais demonstraram que o efeito
19 antinociceptivo de agonistas opioides administrados na região lombar da medula
20 espinhal, pode ser antagonizado, pelo menos em parte, por infusão
21 intracerebroventricular de antagonista opioide (Holmes & Fujimoto, 1992; Lux et al.,
22 1988; Miaskowski & Levine, 1992; Welch et al., 1992). Estes estudos sugerem que a
23 inibição de uma atividade tônica espinhal promove a liberação supraespinhal de

1 opioides endógenos, o que contribuiria para o efeito antinociceptivo observado
 2 (Miaskowski & Levine, 1992). Desde então, vários estudos culminaram na descrição
 3 do que chamamos de *Controle Nociceptivo Ascendente* (Gear et al., 1999).

4



5

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

16

17 O controle nociceptivo ascendente medeia uma forma de analgesia induzida
 18 por estimulação nociceptiva que pode ser evidenciada em uma região distante
 19 daquela onde o estímulo foi aplicado (antinocicepção heterosegmental) e é
 20 semelhante à desencadeada por uma alta dose de morfina (10 mg/kg) (Gear et al.,
 21 1999). Por exemplo, a imersão da pata traseira em água quente, ou a injeção
 22 subdérmica de capsaicina induz antinocicepção demonstrada pela atenuação do
 23 reflexo de abertura bucal (resposta reflexa dos músculos mastigatórios à
 24 estimulação nociceptiva do dente incisivo) (Gear et al., 1999) ou pela diminuição do
 25 comportamento nociceptivo na resposta da formalina orofacial (Tobaldini et al.,
 26 2014).

1 Assim sendo, foi proposto que a estimulação nociceptiva periférica (causada
2 pela injeção de capsaicina ou pela água quente) é o estímulo que desencadeia um
3 complexo mecanismo espinhal, que através de sinapses inibitórias e excitatórias,
4 culmina na inibição de uma atividade tônica ascendente e induz antinocicepção
5 (para detalhes sobre os mecanismos espinais envolvidos no ANC ver, Tambeli et
6 al., 2002; Tambeli et al., 2003a; Tambeli et al., 2003b). Em contrapartida, pouco se
7 sabe sobre os mecanismos supraespinhais envolvidos no controle nociceptivo
8 ascendente. Todavia, o núcleo accumbens (NAc) - uma estrutura mesolímbica
9 prosencefálica localizada no estriado ventral - apresenta participação proeminente
10 nesta circuitaria (ver localização na Figura I). Isto porque a administração de
11 antagonista opioide μ , δ ou não seletivo bloqueia a analgesia induzida pelo controle
12 nociceptivo ascendente, assim como a administração de antagonista colinérgico
13 nicotínico ou dopaminérgico no NAc também (Gear et al., 1999; Schmidt et al.,
14 2002a; Schmidt et al., 2001; Schmidt et al., 2002b). Além disso, a administração de
15 antagonista de receptores colinérgicos nicotínicos no RVM (Gear & Levine, 2009)
16 também é capaz de bloquear a analgesia induzida por estimulação nociceptiva. O
17 envolvimento de outras regiões supraespinhais não é conhecido. Dados em análise
18 por nosso laboratório indicam um possível envolvimento de áreas como a área
19 tegmental ventral, da substância negra e da amígdala na analgesia induzida pelo
20 controle nociceptivo ascendente.

21 Embora a analgesia induzida pela ativação do controle nociceptivo
22 ascendente pareça, em alguns aspectos, àquela induzida pela ativação do DNIC (do
23 inglês *Diffuse Noxious Inhibitory Control*) ou a analgesia do CPM (do inglês,
24 *Conditioned Pain Modulation*) - termos utilizados para referir a analgesia causada
25 por dor em animais e em humanos respectivamente (Nir & Yarnitsky, 2015) – estas
26 diferem do controle nociceptivo ascendente em alguns aspectos. Os efeitos do
27 DNIC/CPM são de curta-duração e dependem da manutenção da estimulação
28 nociva, desaparecendo rapidamente após cessar o estímulo (para revisão Pud et al.
29 (2009)). Em contraste, a analgesia do controle nociceptivo ascendente perdura por
30 mais de uma hora e uma vez iniciada se torna independente de nova estimulação
31 (Tambeli et al., 2009). Além disso, a analgesia do DNIC/CPM é dependente de
32 mecanismos caudais ao RVM, mais especificamente na região do subnúcleo
33 reticular dorsal (ver localização na Figura I) (Le Bars, 2002; Ossipov et al., 2010).

- 1 Enquanto o controle nociceptivo ascendente é a única forma de analgesia induzida
- 2 por dor que dependente de mecanismos no prosencéfalo (Gear et al., 1999).
- 3

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

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

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

1 4 OBJETIVOS

2

3

4 4.1 OBJETIVO GERAL

5

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

8

9 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10

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

14 ➤ Realizar o bloqueio específico do controle nociceptivo ascendente através
15 da administração de antagonista de receptores μ -opioide no NAc e de antagonista
16 nicotínico colinérgico no RVM e verificar se o mesmo é capaz de bloquear a
17 analgesia da injeção da capsaicina neste modelo de dor inflamatória.

18 ➤ Investigar o envolvimento do mecanismo dopaminérgico mesolímbico ao
19 nível do NAc, através de antagonistas de receptores D1 e/ou D2, na analgesia
20 induzida pela injeção de capsaicina.

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

23 ➤ Verificar se o bloqueio específico dos receptores envolvidos com a via
24 descendente ao nível da PAG e do RVM, através da administração de antagonista
25 de receptores μ -opioide e agonista de receptores GABA_A, afeta a analgesia induzida
26 pela injeção de capsaicina

27 ➤ Verificar a importância da integridade da via descendente para a
28 modulação da analgesia mediada pelo controle nociceptivo ascendente através da
29 secção do funículo dorsolateral da medula espinhal.

30 ➤ Verificar se o bloqueio da atividade da via descendente ao nível espinhal,
31 através da administração de antagonistas serotoninérgicos (5HT_{1A} e 5HT-3),
32 adrenérgicos (α 2) e dopaminérgicos (D₂), afeta a analgesia mediada pelo controle
33 nociceptivo ascendente.

- 1 ➤ Quantificar a expressão de proteína c-Fos no NAc, PAG e RVM durante
- 2 as intervenções experimentais, como forma indireta de mensurar a atividade destes
- 3 núcleos quando o controle nociceptivo ascendente está ativado ou não.
- 4

1 5 MÉTODOS

2

3

4 ANIMAIS UTILIZADOS

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

12

13 DROGAS UTILIZADAS

14 Capsaicina (250 μ g), agonista do receptor TRPV1 (receptor de potencial
15 transitório vanilóide-1) inicialmente diluída em tween-80 (50%) e etanol (50%) para
16 uma concentração de 50 μ g/ μ l e então diluída em salina (NaCl 0,9%) até a
17 concentração para uso em experimento (Gear et al., 1999); carragenina- λ (20 ou 100
18 μ g) (Bonet et al., 2013); morfina (5 mg/kg), agonista de receptor opioide (Ozdemir et
19 al., 2012); [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin (DAMGO, 0,3 μ g), agonista de
20 receptor μ -opioide (Schmidt et al., 2002b); Cys²,Tyr³,Orn⁵,Pen⁷amide (CTOP, 0,5
21 μ g), antagonista de receptor μ -opioide (Tobaldini et al., 2014); mecamilamina (0,6
22 μ g), antagonista de receptor nicotínico colinérgico (Gear & Levine, 2009); lidocaine
23 N-ethyl bromide salt (QX-314, 2%), derivado quaternário da lidocaína (Song et al.,
24 2013); muscimol (10 ng), agonista de receptor GABA_A (Gear et al., 1999);
25 WAY100135 (46 μ g), antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A} de serotonina (Holden
26 et al., 2005); tropisetron (10 μ g), antagonista seletivo de receptor 5-HT₃ de
27 serotonina (Alloui et al., 2002); idazoxan (50 μ g), antagonista seletivo de receptor
28 α 2- adrenérgico (Silva et al., 2011); raclopride (1 ou 10 μ g para injeção intra-NAc; ou
29 5 μ g para injeção intratecal), antagonista seletivo de receptor D₂ dopaminérgico
30 (Millan, 2002; Viisanen et al., 2012); SCH23390 (SCH, 1,8 μ g), antagonista seletivo
31 de receptor D₁ dopaminérgico (Schmidt et al., 2002a).

32

33

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

1 PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS

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

7

8 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

9 Os ratos eram posicionados em um instrumento estereotáxico, o crânio foi
10 exposto e um pequeno orifício foi feito para introduzir uma cânula guia de calibre
11 26G dentro do NAc core; PAG ventrolateral ou RVM. Para o NAc core, as
12 coordenadas foram a partir de bregma: 1,3 mm rostral, 7,2 mm dorsoventral e $\pm 1,8$
13 mm lateral, com a barra de incisivo a 3,3 mm (Tobaldini et al., 2014). Para a PAG
14 ventrolateral, as coordenadas foram de lambda: 0 mm anteroposterior, -2 mm lateral
15 e 5,4 mm dorsoventral com um ângulo de $1,8^\circ$ e a barra do incisivo a 2,5 mm
16 (Tomim et al., 2016). Para o RVM, as coordenadas foram da linha inter-aural: 2,3
17 mm caudal e 0,2 mm ventral (Tobaldini et al., 2014). A cânula foi então fixada no
18 crânio com um parafuso e cimento dental. Os experimentos foram realizados 7-9
19 dias após as cirurgias.

20

21 LESÃO DO FUNÍCULO DORSOLATERAL

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

30 O local da lesão e a extensão foram avaliados histologicamente em cada
31 animal após os experimentos. Os ratos foram perfundidos transcardiacamente com
32 solução salina seguida de 4% de formaldeído. As medulas espinhais foram
33 removidas ao nível das lesões e processadas histologicamente (secções de 50 μ m,

1 coradas com vermelho neutro 1%) para permitir a verificação microscópica da
2 extensão e localização da lesão.

3

4 MODELO COMPORTAMENTAL - PARA ESTUDAR A ANALGESIA MEDIADA PELO 5 CONTROLE NOCICEPTIVO ASCENDENTE

6 O controle nociceptivo ascendente foi estudado em animais anestesiados
7 (Gear & Levine, 1995) e acordados (Gear et al., 1999) usando diferentes estratégias
8 experimentais, sempre caracterizadas pela aplicação do estímulo nociceptivo (para
9 induzir analgesia) em uma região do corpo longe de onde é aplicado o estímulo teste
10 (para detectar analgesia). Isso garante que o teste nociceptivo seja realizado em um
11 segmento remoto do local da estimulação nociceptiva, eliminando efeitos
12 intrasegmentais que possam influenciar os ensaios. Por exemplo, o estímulo
13 nociceptivo, comumente uma injeção de capsaicina, pode ser aplicado na pata
14 traseira e a analgesia ser observada no teste de formalina orofacial (Tobaldini et al.,
15 2014).

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

29

30 INJEÇÕES DE DROGAS

31 *Injeções na pata*

32 Seguindo o protocolo detalhado acima, os animais foram gentilmente
33 contidos para receber uma injeção na pata traseira (30 µL) de carragenina ou seu
34 veículo, seguida, 3 horas depois, por uma segunda injeção desta vez na pata

1 dianteira (30 μ L) de capsaicina ou seu veículo. As injeções foram realizadas na
2 superfície dorsal das patas usando uma agulha de calibre 26G conectada a uma
3 cânula de polietileno PE-50 e também a uma microseringa Hamilton de 50 μ L.

4 5 *Microinjeções intracérebro*

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

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

20 21 *Injeção intratecal*

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

32

1 TESTES COMPORTAMENTAIS

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

6

7 *Teste mecânico de retirada de pata*

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

17

18 *Teste do campo aberto*

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

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

28

29 C-FOS IMUNOHISTOQUÍMICA

30 Os ratos foram perfundidos transcardiacamente, sob anestesia geral, com
31 salina seguido de formaldeído a 4% em tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,4. Os
32 encéfalos foram removidos e posteriormente imersos durante 1 semana em
33 formaldeído a 4%. Os encéfalos foram então colocados em 30% de solução de
34 sacarose por 48h antes da secção. Foram realizadas seis secções de 30 µm por

1 animal entre as coordenadas de bregma 1.44 e 1.20 mm para NAc core; entre as
2 coordenadas de bregma -8,04 e -8,28 mm para a PAG ventrolateral; e entre as
3 coordenadas inter-aural -2,16 e -2,40 mm para o RVM (Paxinos & Watson, 2007). As
4 secções de tecido foram incubadas de modo free-floating a 4°C durante toda a noite
5 com anticorpo primário anti-c-Fos de coelho (1: 500 em solução salina tampão
6 fosfato (PBS) mais 0,3% Triton X-100, Chemicon, EUA). As secções foram então
7 incubadas com um anticorpo secundário conjugado com biotina (1: 500, Vector
8 Laboratories, EUA) durante 2h em temperatura ambiente. Após várias lavagens com
9 PBS, o complexo de anticorpos foi localizado utilizando o sistema ABC (kit
10 Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories), seguido de reação com 3,3'-
11 diaminobenzidina com realce por níquel. As secções foram então montadas sobre
12 lâminas revestidas com gelatina e cobertas por lamínula depois da desidratação por
13 concentrações ascendentes de soluções de etanol-xilol (Tobaldini et al., 2014). As
14 lâminas foram digitalizadas em um scanner de microscópio (Axio Imager Z2, Carl
15 Zeiss, Jena, DE) acoplado a um sistema de imagem (Metasystems, Altlussheim,
16 DE). A quantificação de células imunorreativas de c-Fos (c-Fos-ir) foi realizada
17 automaticamente por densidade óptica numa área delimitada utilizando o software
18 de análise de imagem ImageJ 1.37c (de domínio público).

19

20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

21 Os dados do limiar nociceptivo mecânico foram analisados por análise de
22 variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas com 1 fator 'within' (tempo)
23 e 1 fator 'between' (tratamento). Os dados da expressão de c-Fos foram analisados
24 por ANOVA de duas vias com 2 fatores 'between' (injeção na pata traseira e pata
25 dianteira). Os dados da locomoção no campo aberto foram analisados por ANOVA
26 de uma via. Se houvessem diferenças significativas entre os grupos, as diferenças
27 eram testadas utilizando o pós teste de Student-Newman-Keuls para determinar a
28 base da diferença significativa em cada caso. O nível de significância estatística foi p
29 <0,05. Os dados estão plotados em figuras como média \pm erro padrão da média. O
30 software SigmaPlot® (Systat Software, San Jose, CA, EUA) foi utilizado para realizar
31 análise de dados e a representação gráfica.

1 **6 ARTIGO CIENTÍFICO**

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

4
5
6
7 Glauca Tobaldini; Natalia F. Sardi; Vinicius A. Guilhen; Luana Fischer

8
9
10
11
12
13 ^a Department of Physiology, Division of Biological Sciences, Federal
14 University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil

15
16
17
18
19
20
21
22 Corresponding author:

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

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

25
26
27 The authors declare no conflict of interest and source of funding

28
29 **Original Article**

30
31
32
33 **Nota:** Manuscrito submetido à revista PAIN.

34

1 **Abstract**

2 The most powerful known pain modulation pathway is the PAG-RVM
3 (periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla) descending system. In this
4 study we hypothesized that it is functionally linked to the ascending nociceptive
5 control, a form of pain-induced analgesia dependent on mesolimbic
6 mechanisms. To test this hypothesis we used a pharmacological approach, in
7 which the antinociception induced by noxious stimulation (forepaw injection of
8 capsaicin) was detected in rat standard model of inflammatory pain (hindpaw
9 injection of carrageenan). This antinociception was blocked by interventions
10 recognized for blocking ascending nociceptive control-mediated analgesia: the
11 blockade of μ -opioid receptors (CTOP, 0.5 μ g) or of dopamine D1 and D2
12 receptors (SCH23390, 1.8 μ g and raclopride, 5 μ g) within the NAc as well as the
13 blockade of nicotinic acetylcholine receptors (mecamylamine, 0.6 μ g) within the
14 RVM. This antinociception was also blocked by standard interventions
15 recognized for blocking mechanisms of descending inhibition within either the
16 PAG or the RVM: local acute neuronal blockade (lidocaine, 2%); blockade of μ -
17 opioid receptors (CTOP, 0.5 μ g) or activation of GABA_A receptors (muscimol,
18 10ng). Consistently, antinociception was similarly blocked by interventions
19 recognized for blocking spinal mechanisms of descending inhibition: lesion of
20 dorsolateral funiculus and the spinal blockade of serotonergic 5HT_{1A} receptors
21 (WAY100135, 46 μ g); 5HT₃ receptors (tropisetron, 10 μ g) or α 2 adrenergic
22 receptors (idazoxan, 50 μ g). Neuronal activity indirectly estimated by c-Fos
23 expression within the NAc, PAG and RVM correlates well with behavioral
24 observations. Therefore, this study provides functional evidences to argue that
25 noxious stimulation triggers an ascending-descending pain modulation pathway
26 linking the mesolimbic system to the PAG-RVM descending system.

27
28 **Keywords:** pain modulation; ascending nociceptive control;
29 periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla descending system;
30 mesolimbic system; nucleus accumbens; PAG; RVM; spinal cord; opioid;
31 dopamine; noxious stimulation; behavior; rat

32

33

1 **Summary**

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

1 **Introduction**

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

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

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

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

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

17

18

19

1

2 **Material and Methods**

3 **Animals**

4 The experiments were performed in male Wistar rats (270-300 g),
5 housed five per cages with free access to food and water. They were
6 maintained in a room with controlled 12:12-h light/dark cycle and temperature
7 (± 23 °C). All animal experimental procedures and protocols were approved by
8 the Committee on Animal Research of the Federal University of Parana
9 (protocol no 782) and followed the guidelines of the Ethics Standards of the
10 International Association for the Study of Pain in animals.

11

12 **Drugs**

13 Capsaicin (250 μ g), a transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)
14 agonist, was initially dissolved in Tween-80 (50%) and ethanol (50%) to a
15 concentration of 50 μ g/ μ l and then diluted in 0.9% saline (Gear et al., 1999);
16 carrageenan- λ (20 or 100 μ g) (Bonet et al., 2013); morphine (5 mg/kg), an
17 opioid receptor agonist (Ozdemir et al., 2012); [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-
18 enkephalin (DAMGO, 0.3 μ g), a μ -opioid receptor agonist (Schmidt et al.,
19 2002b); Cys²,Tyr³,Orn⁵,Pen⁷amide (CTOP, 0.5 μ g), a μ -opioid receptor
20 antagonist (Tobaldini et al., 2014); mecamylamine (0.6 μ g), a nicotinic
21 acetylcholine receptor antagonist (Gear & Levine, 2009); lidocaine N-ethyl
22 bromide salt (QX-314, 2%), a quaternary derivative of lidocaine (Song et al.,
23 2013); muscimol (10 ng), a GABA_A receptor agonist (Gear et al., 1999);
24 WAY100135 (46 μ g), a selective serotonin 5-HT_{1A} receptor antagonist (Holden
25 et al., 2005); tropisetron (10 μ g), a selective serotonin 5-HT₃ receptor antagonist
26 (Alloui et al., 2002); idazoxan (50 μ g), a selective α 2-adrenoceptor antagonist
27 (Silva et al., 2011); raclopride (1 or 10 μ g for intra-NAc injection; or 5 μ g for
28 intrathecal injection), a selective dopamine-D2 receptor antagonist (Millan,
29 2002; Viisanen et al., 2012); SCH23390 (SCH, 1.8 μ g), a selective dopamine-
30 D1 receptor antagonist (Schmidt et al., 2002a). All drugs were dissolved in 0.9%
31 NaCl and obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) except WAY100135
32 obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

33

1 Pre-Experimental procedures

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

7

8 Stereotaxic Surgery

9 The rats were placed in a stereotaxic instrument, the skull was exposed
10 and a small hole was made to introduce a 26-gauge guide cannula within the
11 NAc core; ventrolateral PAG or RVM. For the NAc core the coordinates were
12 from bregma: 1.3 mm rostral, 7.2 mm dorsoventral, and ± 1.8 mm lateral with
13 incisor bar at 3.3 mm (Tobaldini et al., 2014). For the ventrolateral PAG, the
14 coordinates were from lambda: 0 mm anteroposterior, -2 mm lateral, and 5.4
15 mm dorsoventral, with a 1.8° angle and the incisor bar at 2.5 mm (Tomim et al.,
16 2016). For the RVM, the coordinates were from the intra-aural line: 2.3 mm
17 caudal and 0.2 mm ventral (Tobaldini et al., 2014). The cannula was then fixed
18 to the skull with a screw and dental cement. Experiments were performed 7–9
19 days later.

20

21 Lesion of the dorsolateral funiculus

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

30 Lesion location and extension was histologically assessed in each animal
31 after experiments. The rats were transcardially perfused with saline followed by
32 4% formaldehyde. The spinal cords were removed, at the level of the lesions,

1 and histologically processed (50 μm sections stained with 1% neutral red) to
2 allow the microscopic verification of lesion extension and location.

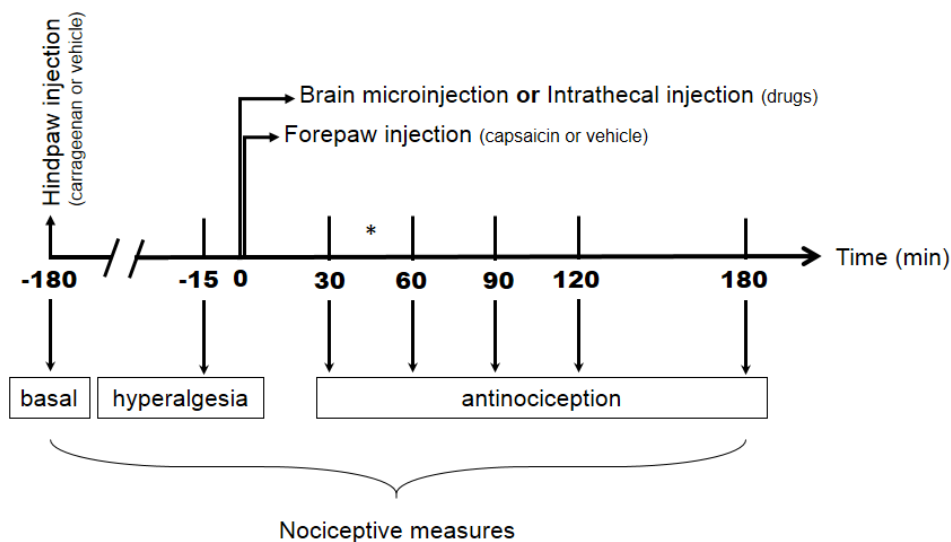
3

4 *Behavioral model to study Ascending nociceptive control-mediated* 5 *analgesia*

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

15 In the present study, the antinociceptive effect induced by a forepaw
16 injection of capsaicin was evaluated in the carrageenan model (Araldi et al.,
17 2013) of hindpaw inflammatory pain (see Figure 1 for experimental design).
18 With this purpose, carrageenan (100 μg) or its vehicle was injected in the
19 hindpaw. Three hours later, when carrageenan-induced hyperalgesia is
20 maximal (Bonet et al., 2013), capsaicin (250 μg) or its vehicle was injected in
21 the forepaw to activate the ascending nociceptive control (Gear et al., 1999).
22 The ability of the forepaw injection of capsaicin to decrease carrageenan-
23 induced hyperalgesia in the hindpaw was tested over time until the
24 antinociceptive effect wore off. Whenever brain microinjections or lumbar
25 intrathecal injections were necessary (to block endogenous pain modulation
26 mechanisms), they were performed immediately before the forepaw injection of
27 capsaicin.

28



1
2
3
4
5
6
7
8
9

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

10 Drugs Injections

11 *Paw Injections*

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

17

18 *Brain Microinjections*

19 Microinjections were performed by inserting a 30-gauge stainless steel
20 injection cannula through the guide cannulas stereotaxically implanted. The
21 injection cannula was connected to a PE-10 polyethylene tube and also to a 2-
22 μ L Hamilton syringe. Injection volume was 0.3 μ L carried out over a period of 60
23 seconds, after which injection cannula was left in place for 30 more seconds to
24 minimize backflow along the cannula tract. Injection sites were histologically
25 verified in each animal after experiments. Under anesthesia, Evans blue dye
26 (1%, 0.5 μ L) was microinjected and the rats were transcardially perfused with
27 saline followed by 4% formaldehyde. Coronal sections (50 μ m) were performed

1 to allow the microscopic verification of dye location and spread (Paxinos &
2 Watson, 2007). Only animals in which the dye was restricted to the selected
3 nucleus were included in the figures and data analysis.

4 5 *Intrathecal Drug Administration*

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

16 17 Behavioral Testing

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

21 22 *Mechanical paw withdrawal test*

23 The mechanical nociceptive threshold was assessed by the Randall–
24 Selitto test (Randall & Selitto, 1957) (Randall-Selitto apparatus, Insight, Ribeirão
25 Preto, Brazil), its decrease was used as a measure of hyperalgesia
26 (nociception), while its increase as a measure of analgesia (antinociception). In
27 this test, an increasing pressure (weight in grams) is applied to the dorsal
28 surface of the rat's hindpaw until the animal withdrew its paw. The value in
29 grams obtained from the mean of three readings (performed in intervals of two
30 minutes in a blinded fashion) represents the mechanical nociceptive threshold.
31 Data were expressed in figures as variation (after – before) from the basal (pre-
32 experiment) value over time following interventions.

33

1

2 *Open-Field Test*

3 The open-field test was used to provide an overall indication of locomotor
4 activity, discarding the possibility that microinjections or surgery procedures
5 affected animals' motor behavior and their response to the nociceptive tests.
6 The open-field arena consists of a circular area (90 cm of diameter), divided into
7 12 squares, limited by a 50-cm-high wall. The exploratory behavior was
8 quantified by the number of crossed squares during 1 minute. The test was
9 performed between 30 and 60 minutes of the experimental time-course (see
10 Figure 1).

11

12 c-Fos Immunohistochemistry

13 The rats were transcardially perfused, under general anesthesia, with
14 0.9% NaCl followed by 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4.
15 Brains were removed and subsequently immersed for 1 week in formaldehyde
16 at 4%. The brains were then placed in 30% sucrose solution for 48 h before
17 sectioning. Six sections of 30 μ m per animal were taken between bregma 1.44
18 and 1.20-mm coordinates to NAc; between bregma -8.04 and -8.28-mm
19 coordinates to ventrolateral PAG; and between interaural -2.16 and -2.40-mm
20 coordinates to RVM (Paxinos & Watson, 2007). Tissue sections were incubated
21 overnight at 4 °C with rabbit anti-c-Fos primary antibody (1:500 in phosphate
22 buffer saline (PBS) plus 0.3% Triton X-100; Chemicon, USA). Sections were
23 then incubated with a biotin-conjugated secondary antibody (1:500, Vector
24 Laboratories, USA) for 2 h at room temperature. After several washes with PBS,
25 the antibody complex was localized using the ABC system (Vectastain ABC
26 Elite kit, Vector Laboratories) followed by reaction with 3,3'-diaminobenzidine
27 with nickel enhancement. The sections were then mounted onto gelatin-coated
28 slides and coverslipped after dehydration by ascending concentrations of
29 ethanol-xylene solutions (Tobaldini et al., 2014). The slides were digitized with
30 a microscope scanner (Axio Imager Z2, Carl Zeiss, Jena, DE) coupled to an
31 imaging system (Metasystems, Altlussheim, DE). Quantification of c-Fos
32 immunoreactive (c-Fos-ir) cells was performed automatically by optical density

1 in an area delimited using ImageJ 1.37c (Public Domain) image analysis
2 software.

3

4 Statistical Analysis

5 Data from mechanical nociceptive threshold were analyzed by repeated-
6 measures analysis of variance (ANOVA) with 1 within-subjects factor (time) and
7 1 between-subjects factor (treatment). Data from c-Fos expression were
8 analyzed by ANOVA with 2 (hindpaw and forepaw injections) between-subjects
9 factor. Data from locomotion in the open field were analyzed by one-way
10 ANOVA. If there were significant differences between groups, post-hoc
11 contrasts, using the Student-Newman-Keuls test were performed to determine
12 the basis of the significant difference in each case. The level for statistical
13 significance was $p < 0.05$. Data are plotted in figures as mean \pm S.E.M.
14 SigmaPlot® software (Systat Software, San Jose, CA, USA) was used to
15 perform data analysis and graphical representation.

16

17

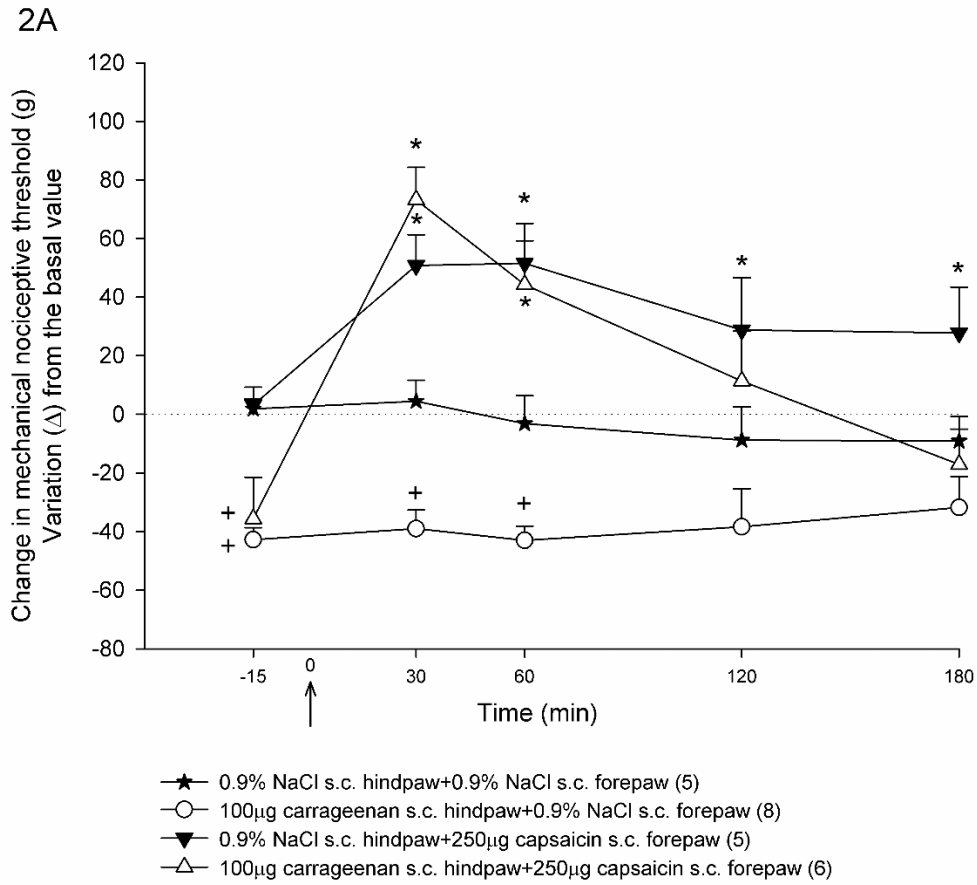
1 **Results**

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

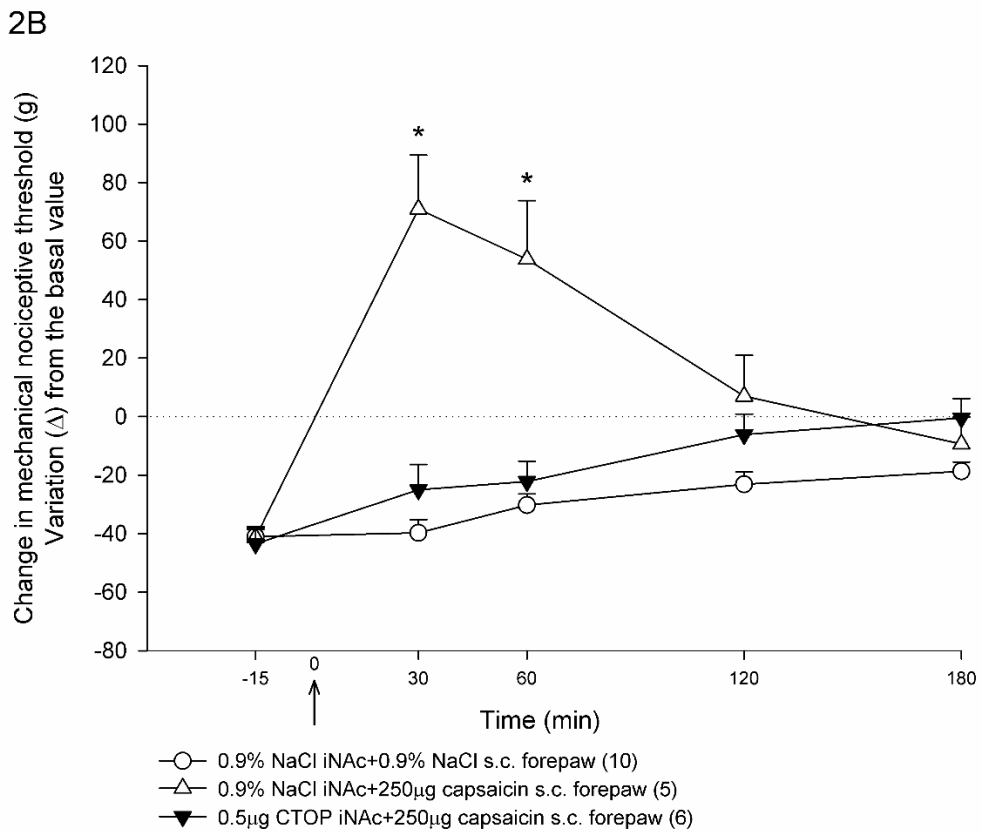
4 The subcutaneous administration of carrageenan into the hindpaw
5 significantly decreased the mechanical nociceptive threshold, which is referred
6 as hyperalgesia (Figure 2A, $p = 0.003$, shown in figures as the decrease in paw
7 withdrawal threshold from the basal (pre-injection) value). The effect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

20 To make sure that the antinociceptive effect of noxious stimulation with
21 capsaicin depends on ascending nociceptive control activation, we blocked its
22 mechanisms within the NAc and the RVM. The administration of a μ -opioid
23 receptor antagonist (CTOP) into the NAc, at a dose known to block the
24 ascending nociceptive control, prevented ($p = 0.002$) the antinociceptive effect
25 induced by capsaicin (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls
26 post hoc test; Figure 2B: $F_{\text{treatment}} (2,18) = 13.715$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (8,66) = 14.728$, $p < 0.001$). Similarly, the co-administration of a dopamine D1
28 (SCH23390) and D2 (raclopride) receptor antagonists into the NAc prevented (p
29 $= 0.013$) capsaicin-induced antinociception, while each antagonist alone had an
30 intermediate effect (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls
31 post hoc test; Figure 2C: $F_{\text{treatment}} (4,31) = 4.753$, $p < 0.004$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (16,119) = 6.505$, $p < 0.001$).

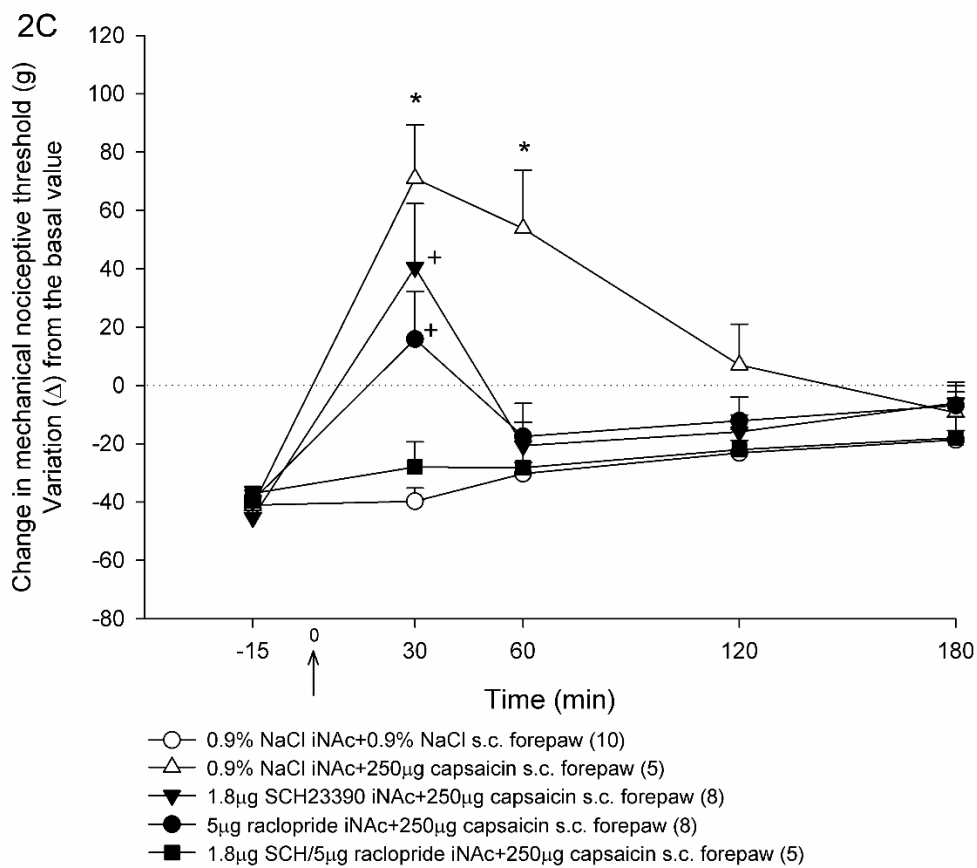
33



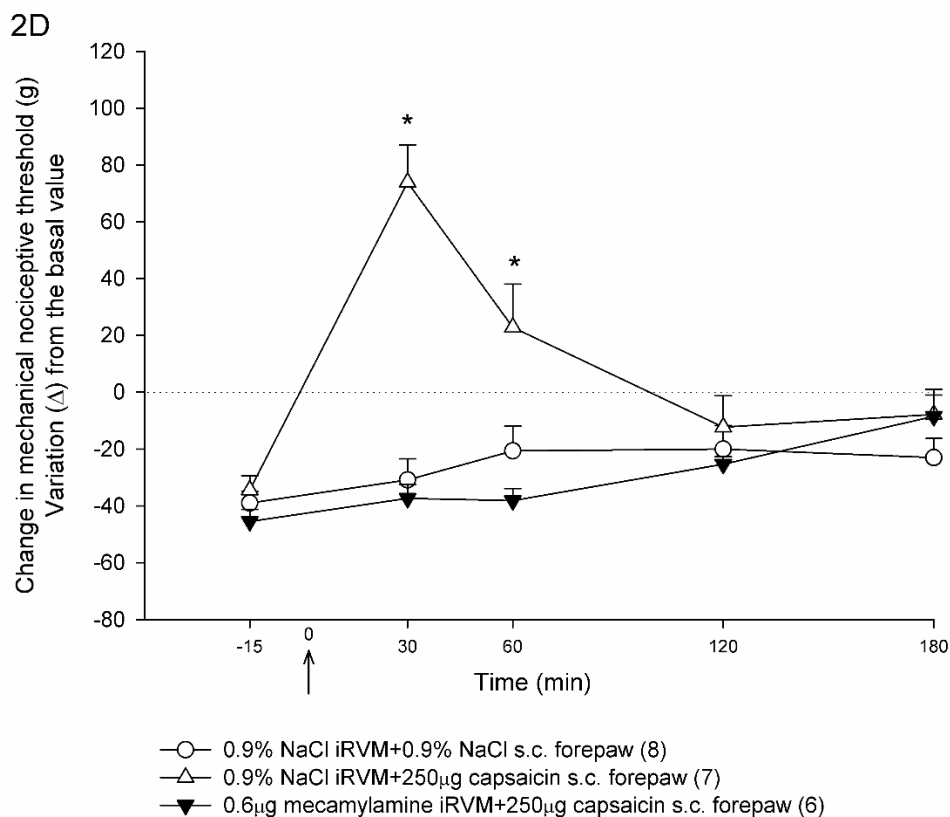
1



2



1



2

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

21 Although the standard dose of carrageenan (100 μ g) induces an intense
 22 hyperalgesic response, optimal to evaluate the efficacy of antinociceptive
 23 strategies in inflammatory pain, the decrease in paw withdrawal threshold is
 24 close to the test limit. For this reason, the effect of each drug by itself on
 25 carrageenan-induced hyperalgesia was evaluated using a lower dose of
 26 carrageenan (20 μ g). This dose induces an intermediate decrease in paw
 27 withdrawal threshold, optimal to observe any tendency of drugs to further
 28 decrease (or increase) mechanical nociceptive threshold (repeated-measures
 29 ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 A:
 30 $F_{\text{treatment}}(2,18) = 11.219, p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(8,72) = 1.025, p = 0.426$). By
 31 themselves, neither CTOP nor the combination of raclopride and SCH23390
 32 (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test;
 33 Supplementary Figure S2 B: $F_{\text{treatment}}(2,10) = 0.679, p = 0.529$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}$
 34 $(8,39) = 1.091, p = 0.390$) affected carrageenan-induced hyperalgesia.

35 The administration of a nicotinic acetylcholine receptor antagonist
 36 (mecamylamine) into the RVM, at a dose known to block the ascending
 37 nociceptive control, prevented ($p = 0.003$) capsaicin-induced antinociception
 38 (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure
 39 2D: $F_{\text{treatment}}(2,18) = 8.784, p = 0.002$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(8,68) = 12.956, p < 0.001$).
 40 By itself, the administration of mecamylamine into the RVM, did not change
 41 carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures ANOVA and Student-

1 Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 C: $F_{\text{treatment}} (4,15) =$
2 0.067 , $p = 0.991$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (12,45) = 1.069$, $p = 0.407$).

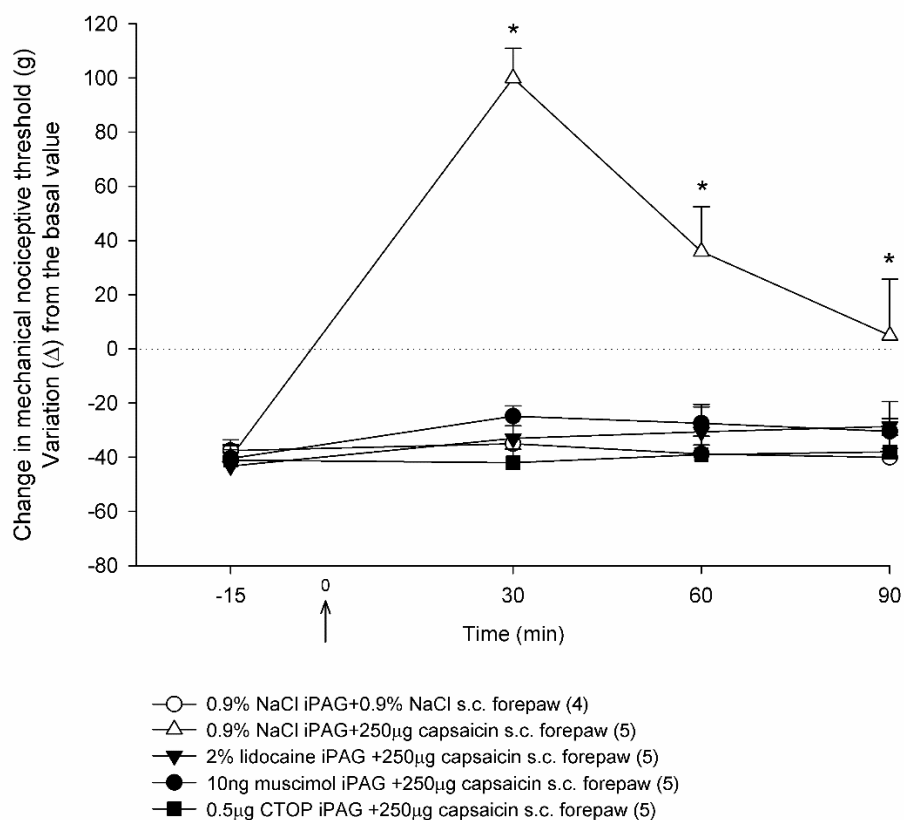
3

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

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

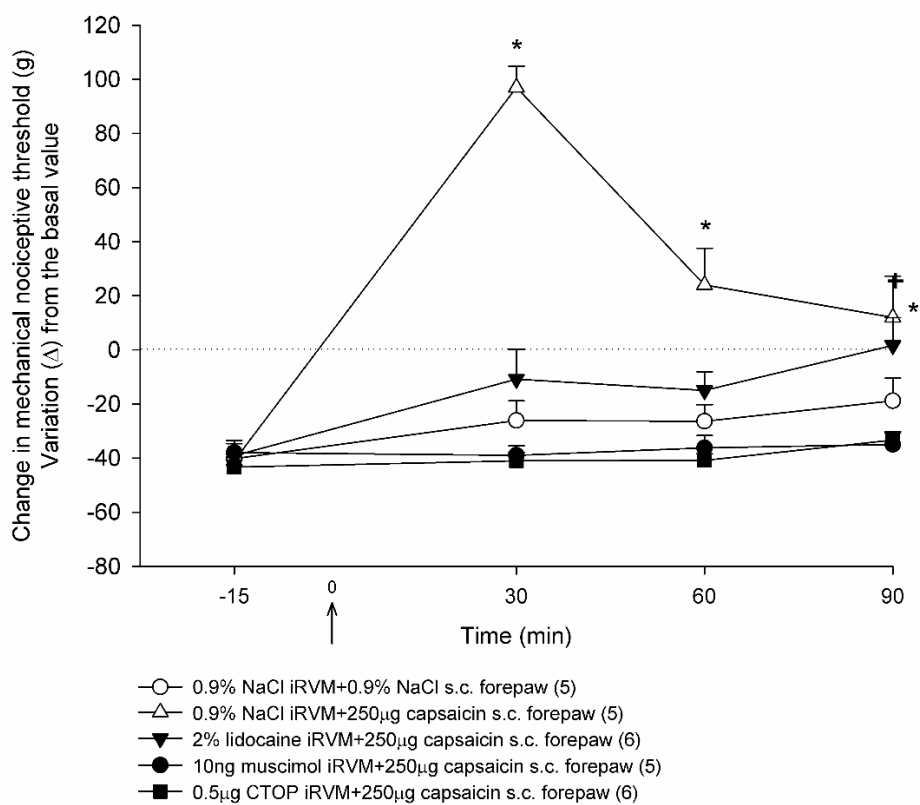
10 The blockade of PAG neural activity by the local administration of a
11 quaternary derivative of lidocaine (QX-314) prevented capsaicin-induced
12 antinociception ($p < 0.001$), showing that neural activity within the PAG is
13 essential to such effect. The selective pharmacological blockade of μ -opioid
14 receptors (by CTOP, $p < 0.001$), as well as activation of GABA_A receptors (by
15 muscimol, $p < 0.001$) within the PAG prevented capsaicin-induced
16 antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post
17 hoc test; Figure 3A: $F_{\text{treatment}} (4,19) = 12.219$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (12,57) =$
18 24.295 , $p < 0.001$). By themselves, neither QX-314, nor CTOP or muscimol
19 within the PAG change carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures
20 ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 D:
21 $F_{\text{treatment}} (3,12) = 0.273$, $p = 0.844$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (9,36) = 0.926$, $p = 0.514$).
22 Noteworthy, the administration of a μ -opioid receptor agonist (DAMGO) into the
23 PAG of pain free animals (hindpaw injection of saline instead of carrageenan)
24 induced an antinociceptive effect similar in magnitude and time-course to that
25 induced by capsaicin (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls
26 post hoc test; Supplementary Figure S3: $F_{\text{treatment}} (2,14) = 3.563$, $p < 0.050$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}} (4,28) = 1.594$, $p = 0.204$). Since μ -opioid receptor agonists within
27 the PAG are classically known to activate the descending inhibitory system, this
28 finding demonstrates a strong similarity between the antinociceptive effect
29 induced by capsaicin and by the descending system.
30

3A



1

3B



2

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

10
11 Consistently, the blockade of RVM neural activity by the local
12 administration of QX-314 also prevented capsaicin-induced antinociception ($p <$
13 0.001), showing that neural activity within the RVM is essential to such effect.
14 The selective pharmacological blockade of μ -opioid receptors ($p < 0.001$), as
15 well as activation of GABA_A receptors ($p < 0.001$) within the RVM prevented
16 capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-
17 Newman-Keuls post hoc test; Figure 3B: $F_{\text{treatment}}(4,24) = 31.970$, $p < 0.001$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(12,68) = 11.021$, $p < 0.001$). By themselves, neither QX-314, nor
18 CTOP or muscimol within the RVM change carrageenan-induced hyperalgesia
19 (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test;
20 Supplementary Figure S2 C: $F_{\text{treatment}}(4,15) = 0.067$, $p = 0.991$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(12,45) = 1.069$, $p = 0.407$). Since activation of μ -opioid receptors and inhibition
21 of GABA_A receptors within the PAG and RVM are key mechanisms underlying
22 inhibitory descending activity, these findings provide the first piece of evidence
23 that the ascending nociceptive control-mediated analgesia depends on the
24 descending pain modulation system.
25
26

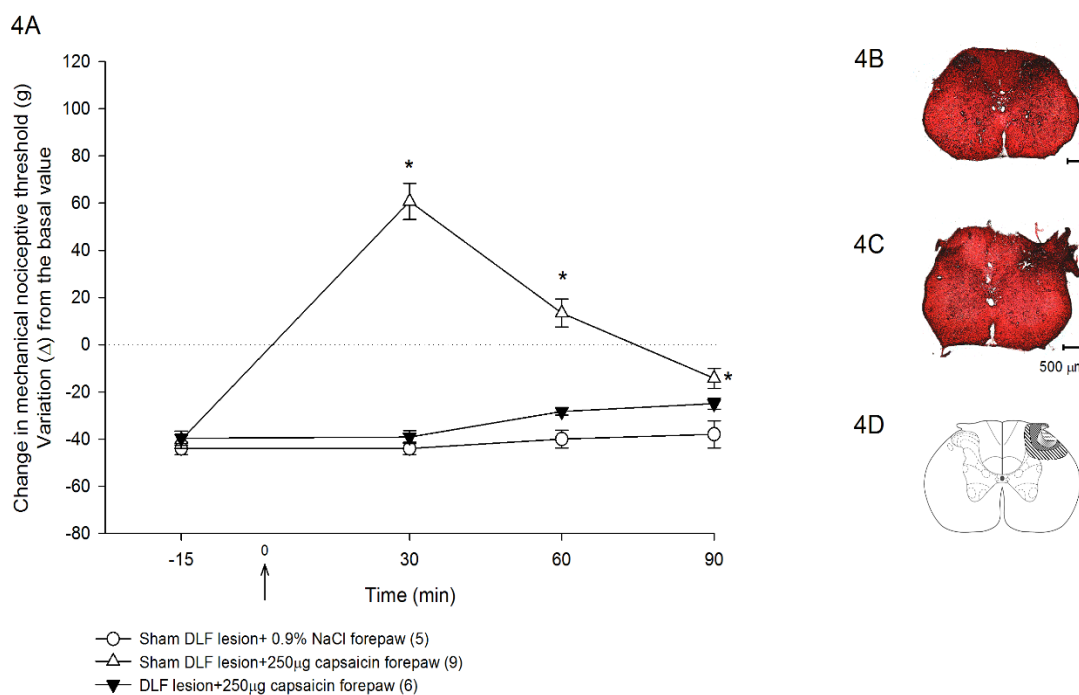
27
28 *The antinociceptive effect mediated by the activation of ascending*
29 *nociceptive control depends on descending projections through the dorsolateral*
30 *funiculus.*

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

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

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

8 Since descending pathways from PAG and RVM reach the dorsal horn to
 9 modulate nociceptive transmission by traveling through the DFL, this finding
 10 provides the second piece of evidence that the ascending nociceptive control-
 11 mediated analgesia depends on the descending pain modulation system.
 12



13

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

23

24

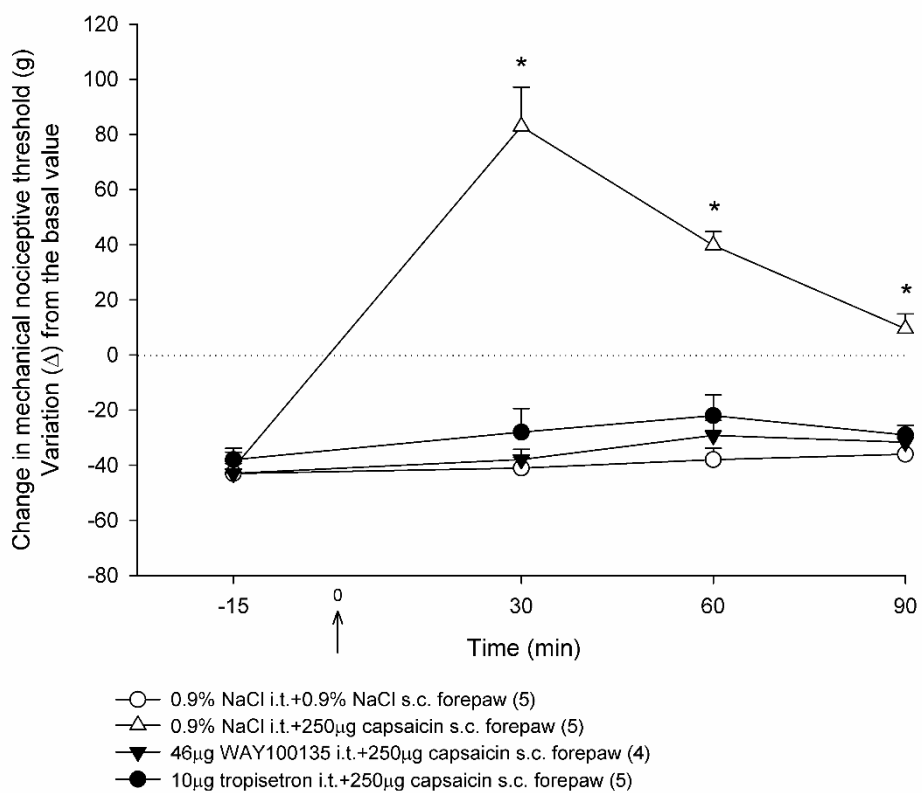
1 *The antinociceptive effect mediated by the activation of ascending*
2 *nociceptive control depends on spinal noradrenergic and serotonergic activity.*

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

7 The administration of either a serotonergic 5HT_{1A} receptor antagonist
8 (WAY100135, $p < 0.001$) or a 5HT₃ receptor antagonist (tropisetron, $p < 0.001$)
9 prevented capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and
10 Student-Newman-Keuls post hoc test; Figure 5A: $F_{\text{treatment}}(3,17) = 45.833$, $p < 0.001$;
11 $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(9,51) = 13.218$, $p < 0.001$). Similarly, the administration of a
12 selective α_2 -adrenoceptor antagonist (idazoxan, $p < 0.001$) also prevented
13 capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-
14 Newman-Keuls post hoc test; Figure 5B: $F_{\text{treatment}}(2,13) = 60.755$, $p < 0.001$;
15 $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(6,39) = 10.871$, $p < 0.001$). In contrast, the administration of a
16 selective dopamine D2-like receptor antagonist did not significantly affect
17 capsaicin-induced antinociception (repeated-measures ANOVA and Student-
18 Newman-Keuls post hoc test; Figure 5C: $F_{\text{treatment}}(3,19) = 24.652$, $p < 0.001$;
19 $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(9,57) = 10.089$, $p < 0.001$). By themselves, none of the antagonists
20 changed carrageenan-induced hyperalgesia (repeated-measures ANOVA and
21 Student-Newman-Keuls post hoc test; Supplementary Figure S2 E: $F_{\text{treatment}}$
22 $(5,19) = 0.557$, $p = 0.732$; $F_{\text{treatment} \times \text{time}}(15,57) = 1.285$, $p = 0.242$). Since the
23 descending pathways involved in pain modulation are mostly serotonergic and
24 noradrenergic, these findings provide the third piece of evidence that the
25 ascending nociceptive control-mediated analgesia depends on the descending
26 pain modulation system.

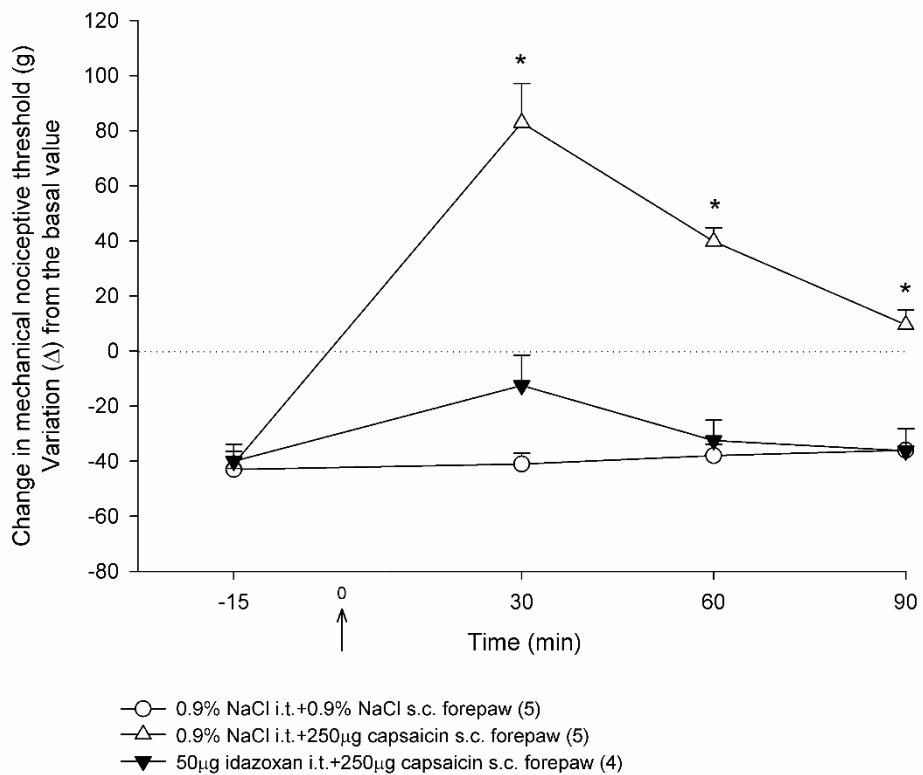
27
28
29
30
31

5A

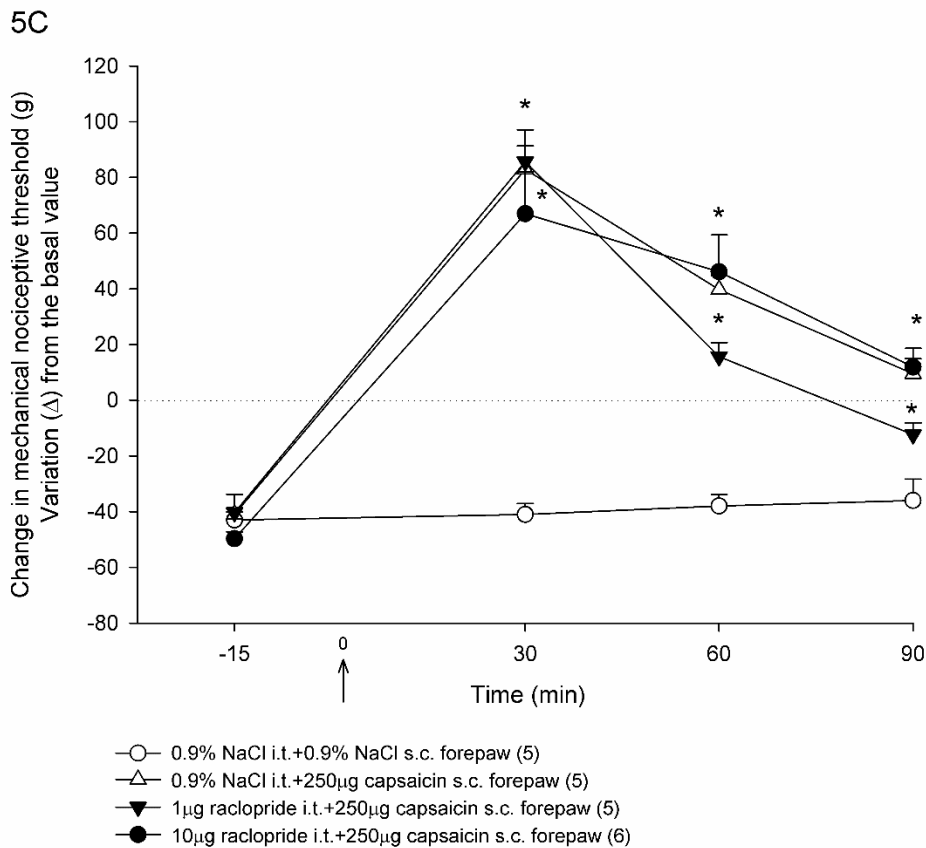


1

5B



2



1
 2 **Figure 5. Capsaicin-induced antinociception on carrageenan-induced hyperalgesia**
 3 **depends on spinal serotonergic and adrenergic but not dopamine receptors.** (A)
 4 Capsaicin-induced antinociception in animals that have received the hindpaw injection of
 5 carrageenan (indicated by the symbol “*”) was prevented by the intrathecal administration of
 6 WAY100135 (a 5HT_{1A} serotonin receptor antagonist); tropisetron (a 5HT₃ serotonin receptor
 7 antagonist) or (B) idazoxan (a α₂ adrenergic receptor antagonist) but not that of (C) raclopride
 8 (a D₂ dopamine receptor antagonist) (repeated-measures ANOVA and Student-Newman-Keuls
 9 post hoc test, $p < 0.05$). See Supplementary Figure S2 and results section for details regarding
 10 the effect of the antagonists by themselves on carrageenan-induced hyperalgesia. The groups
 11 0.9% NaCl i.t.+0.9% NaCl s.c. forepaw and 0.9% NaCl i.t.+250µg capsaicin s.c. forepaw in
 12 figures B e C were replotted from Figure A.

13
 14
 15 *c-Fos expression in NAc, PAG and RVM.*

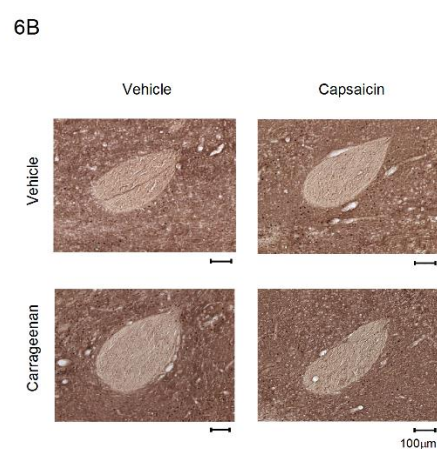
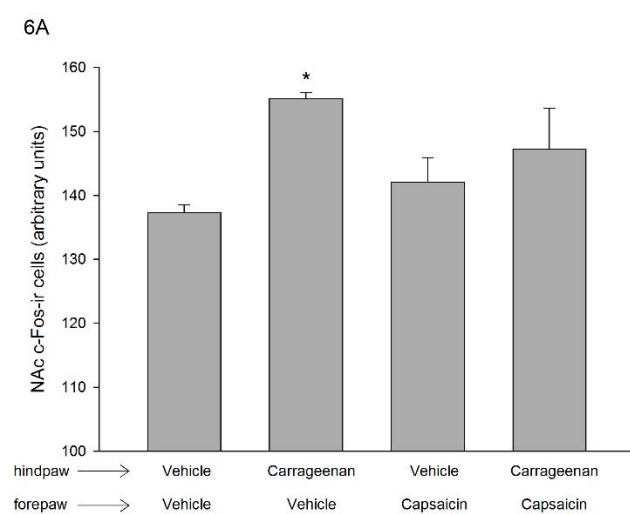
16 To indirectly estimate neural activity within the NAc, PAG and RVM we
 17 quantified local c-Fos protein expression, which rapidly and transiently
 18 increases in response to neuronal firing.

19 Within the NAc, c-Fos expression significantly increased with the
 20 hindpaw injection of carrageenan ($p = 0.006$), an effect prevented by the
 21 forepaw injection of capsaicin ($p = 0.168$). The forepaw injection of capsaicin (p
 22 $= 0.393$) by itself had no effect (two-way ANOVA and Student-Newman-Keuls
 23 post hoc test Figure 6A: $F_{\text{hindpaw} \times \text{forepaw}} (1,12) = 2.774, p = 0.122$).

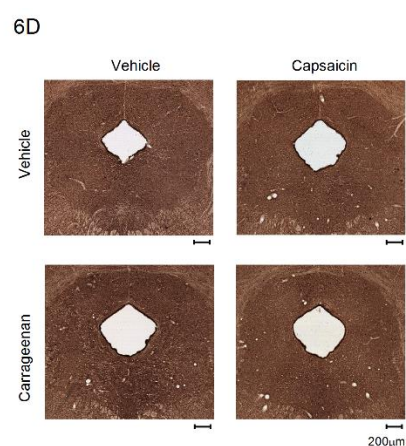
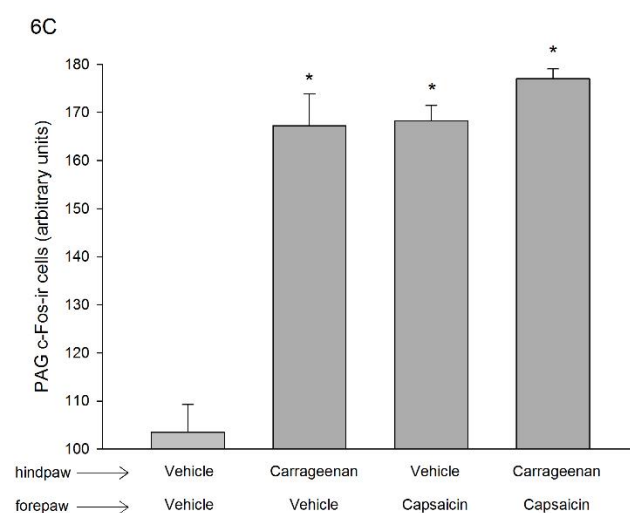
1 Within the PAG, c-Fos expression significantly increased with the
 2 injection of either carrageenan ($p < 0.001$) or capsaicin ($p < 0.001$) and
 3 carrageenan plus capsaicin ($p < 0.001$) (two-way ANOVA and Student-Newman-
 4 Keuls post hoc test Figure 6C: $F_{\text{hindpaw} \times \text{forepaw}}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

5 Within the RVM, a non-significant tendency of c-Fos expression to
 6 increase with the different treatments was detected (two-way ANOVA and
 7 Student-Newman-Keuls post hoc test Figure 6D: $F_{\text{hindpaw} \times \text{forepaw}} (1,12) = 2.373,$
 8 $p = 0.149$).

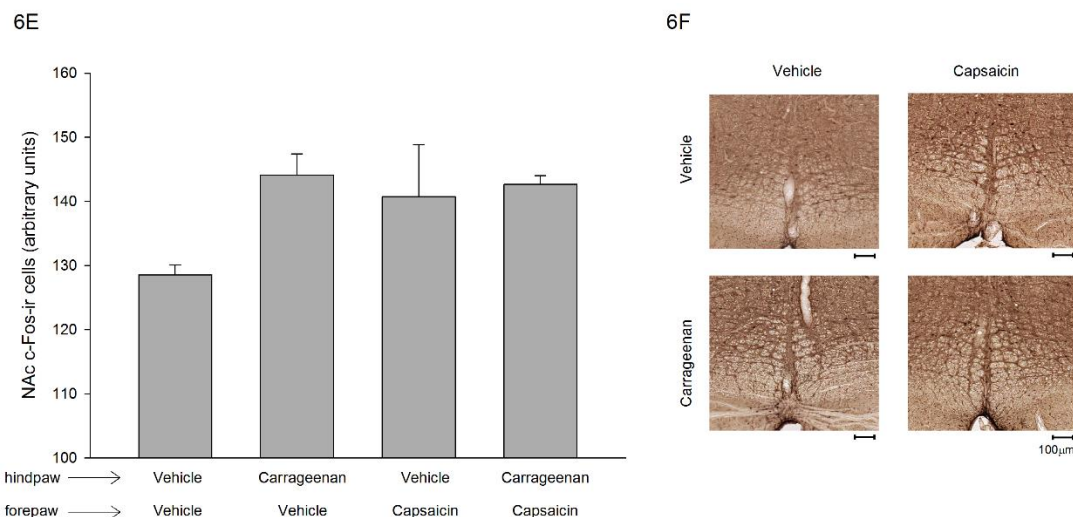
9 Representative photomicrographs of c-Fos-ir cells within the NAc, PAG
 10 and RVM are shown in figures 6B, 6D and 6F respectively.



11



12

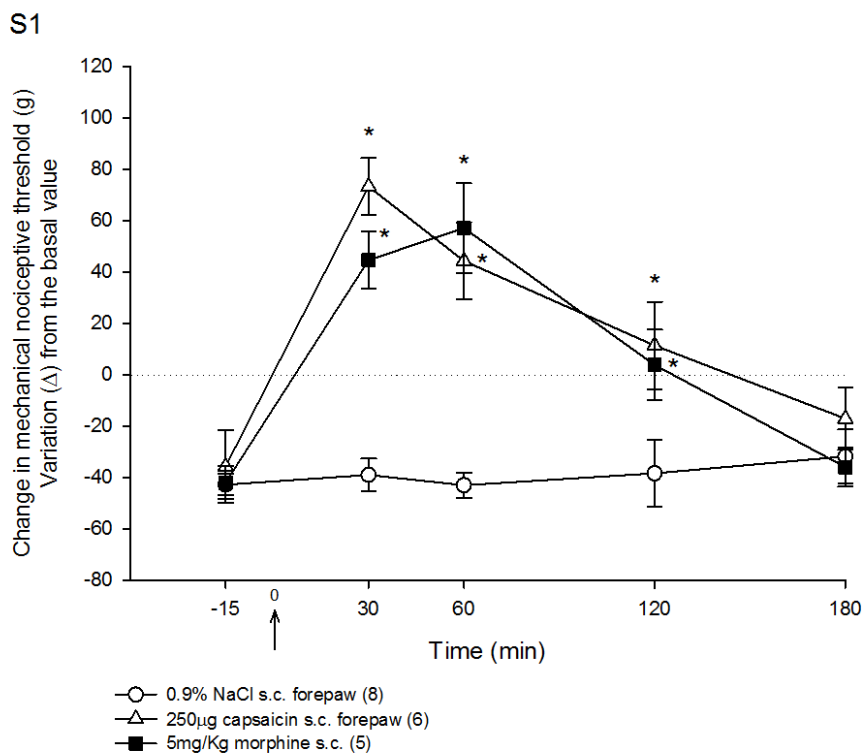


1
2 **Figure 6. c-Fos expression in the NAc, PAG and RVM. (A)** The hindpaw injection of
3 carrageenan significantly increased c-Fos-immunoreactive (c-Fos-ir) optical density within the
4 NAc (indicated by the symbol “**”); the forepaw injection of capsaicin reversed this effect and did
5 not affect c-Fos-ir optical density by itself. **(C)** All three experimental interventions significantly
6 increased c-Fos-ir optical density within the PAG **(E)** c-Fos-ir optical density within the RVM was
7 not significantly changed (two-way ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test, $p < 0.05$).
8 The brains were collected 30 minutes after forepaw injection. Representative photomicrographs
9 of c-Fos-ir cells (10x magnification) within the **(B)** NAc, **(D)** PAG and **(F)** RVM. Scale bar are
10 represented in the figures.
11

12 *Locomotor activity*

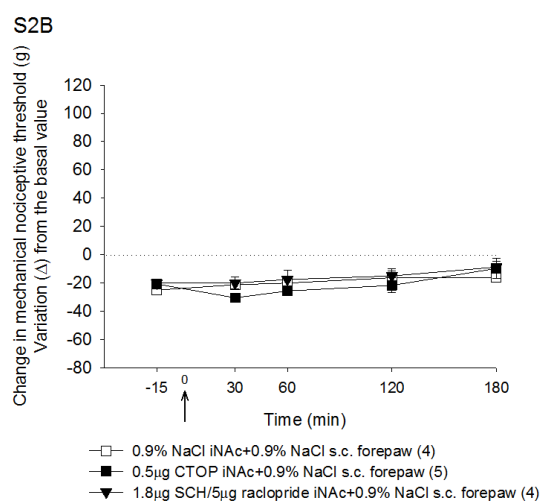
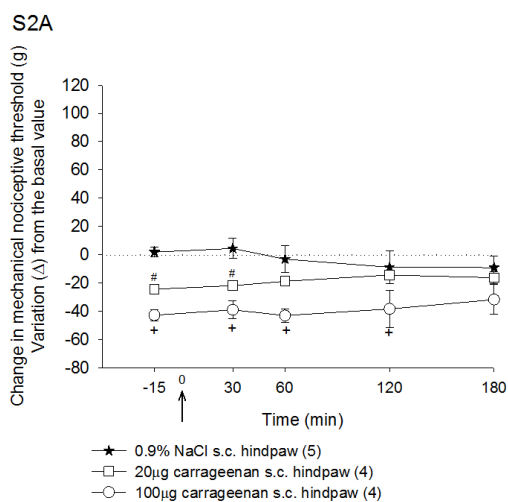
13 Locomotion in the open field test did not significantly change with
14 different treatments and experimental manipulations (Supplementary Table S1).

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

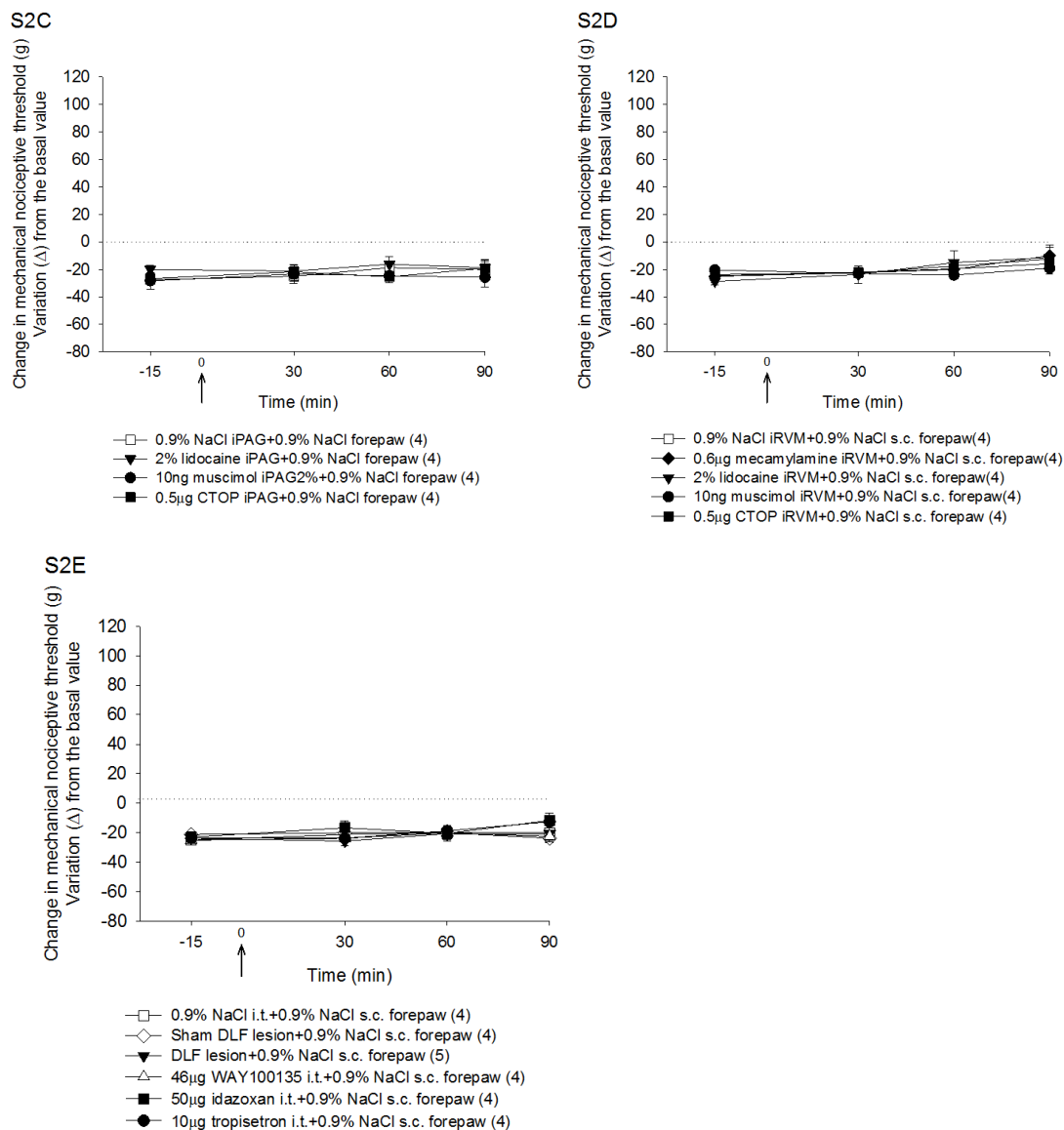


1
2
3
4
5
6
7
8
9

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



10



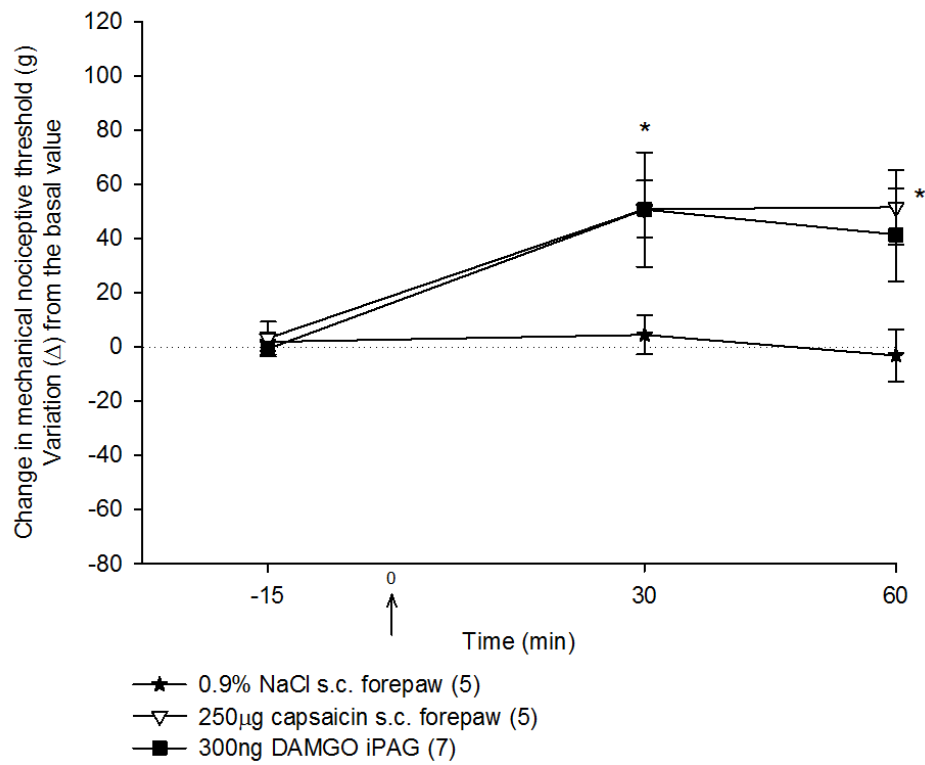
1

2

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

14

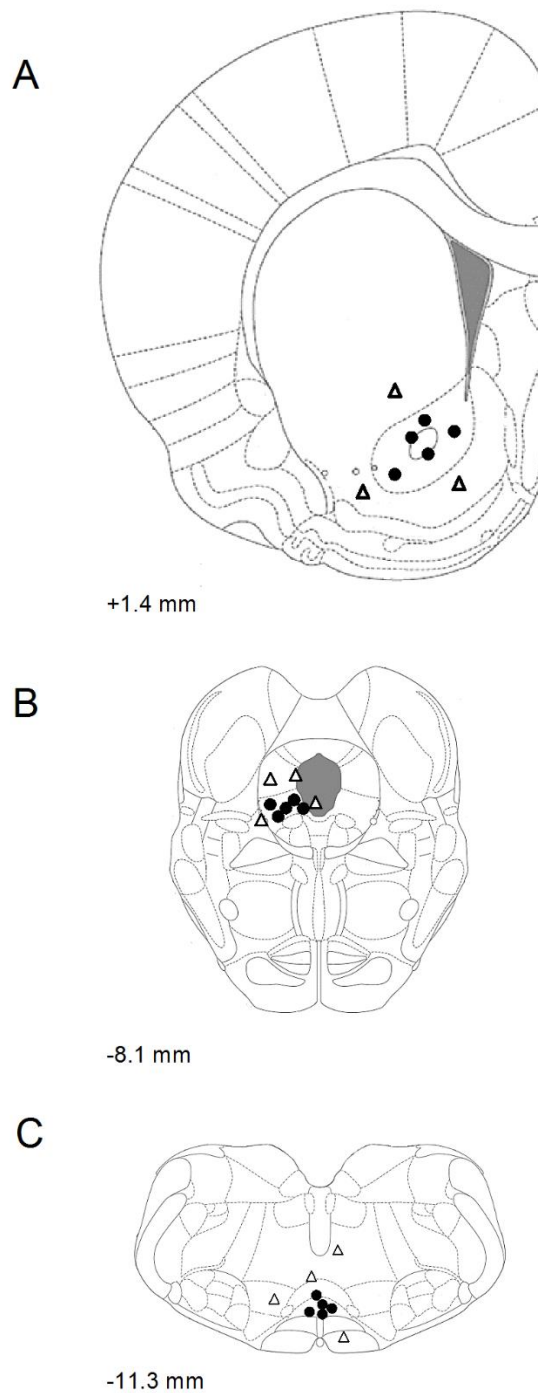
S3



1

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

9



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

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

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

1

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

7

8

9

10

1 **Discussion**

2 This study describes an ascending-descending pain modulation pathway
3 triggered by pain and dependent on the NAc and on the PAG-RVM descending
4 system. The ascending component, named ascending nociceptive control is triggered
5 by noxious stimulation and induces potent and long lasting remote antinociception
6 dependent on opioidergic and dopaminergic mechanisms within the NAc (Gear et al.,
7 1999; Schmidt et al., 2002a). The descending component is the most powerful known
8 pain modulation mechanism, the PAG-RVM descending system (Fields, 2004; Millan,
9 2002). The functional link between the two components was demonstrated using a
10 pharmacological approach, in which the antinociception induced by noxious
11 stimulation was prevented either by all the already known supraspinal interventions
12 that block the ascending component or by standard interventions known to block the
13 descending one. To our knowledge, this is the first description of a spinal-forebrain-
14 midbrain-spinal pathway for pain modulation.

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

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

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

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

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

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

15 Neuronal activity indirectly estimated by c-Fos expression within the NAc, PAG
16 and RVM appears to correlate well with behavioral observations. Within the NAc, c-
17 Fos expression increased with carrageenan-induced hyperalgesia and this effect was
18 prevented by the forepaw injection of capsaicin (Figure 6A). Since NAc activity is
19 pronociceptive and analgesia mediated by the ascending nociceptive control
20 depends on its inhibition (Gear & Levine, 2011), increased c-Fos expression with
21 carrageenan may reflect increased NAc activity during hyperalgesia.
22 Complementarily, the decrease in c-Fos expression with capsaicin may reflect
23 inhibition of NAc to induce antinociception. Within the PAG, c-Fos expression
24 significantly increased in response to peripheral stimulation, no matter if it was with
25 carrageenan, capsaicin or both together (Figure 6C). The same effect was observed
26 within the RVM (Figure 6E), but failed significance. This may reflect increased PAG
27 and RVM activity during either inflammatory hyperalgesia or endogenous analgesia,
28 something expected considering their role on pain processing and modulation. In
29 fact, previous studies have demonstrated increased c-Fos expression within the PAG
30 and the RVM in response to either nociceptive activity (Han et al., 2003; Keay &
31 Bandler, 1993) or endogenous analgesia (Lloyd et al., 2007).

32 Nucleus accumbens is the critical target of the dopaminergic mesolimbic
33 system which, along with its well-known role in reward and motivation (Berridge &
34 Kringelbach, 2015), has been shown to have an important role in pain modulation (for

1 excellent reviews see (Baliki & Apkarian, 2015; Navratilova et al., 2015)). However, in
2 the current literature panorama, the mesolimbic and the descending system appear
3 to modulate pain through totally independent mechanisms, to such an extent that
4 important revisions in each system, barely mention the other one (Baliki & Apkarian,
5 2015; De Felice & Ossipov, 2016). In fact, although the PAG is anatomically
6 connected with the ventral tegmental area and the NAc (Kirouac et al., 2004; Suckow
7 et al., 2013) and evidences dating from the early 1990s suggest a bidirectional opioid
8 loop between them (Ma & Han, 1991; Ma et al., 1992; Yu & Han, 1990), to our
9 knowledge this is the first evidence linking the descending and mesolimbic systems
10 in an endogenous pain modulation mechanism. Recently Baliki and Apkarian have
11 proposed that acute pain experience depends on peripheral nociceptive drive and on
12 a threshold phenomenon, responsible to determine when nociception turns to pain
13 perception (Baliki & Apkarian, 2015). This nociception-pain threshold is supposed to
14 be dependent on mesolimbic activity, however the underlying mechanistic basis is
15 unclear. The findings from the present study fit well as a possible mechanism in this
16 scenario, because the descending system has a powerful ability to decrease
17 nociceptive transmission, which consequently increases the pain perception
18 threshold. Evidently, further studies are needed to support this idea as well as to
19 determine whether the mesolimbic system connects with the descending system
20 through cortical or subcortical circuitry.

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

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

14

15 **Acknowledgments**

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

1 7 DISCUSSÃO

2

3

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

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

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

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

4 O envolvimento do sistema descendente PAG-RVM na antinocicepção
5 mediada pelo controle nociceptivo ascendente já foi investigado anteriormente e
6 descartado, uma vez que a administração de naloxona na PAG ou no RVM não
7 afetou a antinocicepção (Gear et al., 1999; Gear & Levine, 1995). Esses achados
8 foram interpretados como evidências de que ambos os sistemas são independentes
9 porque os mecanismos opioides intra-PAG e -RVM são a base neural do sistema
10 descendente (Fields, 2004). No entanto, neste estudo revisamos essa interpretação
11 fornecendo dados substanciais para argumentar que ambos os sistemas estão
12 funcionalmente vinculados. A evidência inicial é que a inativação neuronal da PAG
13 (Figure 3A) ou do RVM (Figure 3B) pela injeção local de lidocaína impediu a
14 antinocicepção induzida por capsaicina. Esses achados demonstram que tanto a
15 PAG como o RVM são essenciais para a antinocicepção mediada pelo controle
16 nociceptivo ascendente. Além disso, o bloqueio dos receptores μ -opioide, bem como
17 a ativação dos receptores GABA_A intra-PAG (Figure 3A) ou -RVM (Figure 3B)
18 impediram a antinocicepção induzida por capsaicina. Estes procedimentos
19 bloqueiam a atividade descendente inibitória (Lane et al., 2005; Lau & Vaughan,
20 2014; Vaughan et al., 1997; Yaksh et al., 1976) porque os neurônios responsáveis
21 pelo seu controle estão sob tônica inibição GABAérgica que pode ser suprimida
22 pelos mecanismos μ -opioide (Fields, 2004; Millan, 2002). Portanto, o bloqueio de
23 mecanismos descendentes inibitórios intra-PAG ou intra-RVM bloqueia a
24 antinocicepção mediada pelo controle nociceptivo ascendente.

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

1 agora ao nível da coluna vertebral, os procedimentos classicamente conhecidos por
2 bloquear a antinocicepção mediada pelo sistema descendente, também bloqueiam a
3 mediada pelo controle nociceptivo ascendente.

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

16 A atividade neuronal, indiretamente estimada pela expressão de c-Fos, no
17 NAc, PAG e RVM correlaciona-se bem com as observações comportamentais. No
18 NAc, houve um aumento na expressão de c-Fos com a hiperalgesia induzida por
19 carragenina e este efeito foi prevenido pela injeção da capsaicina na pata dianteira
20 (Figure 6A). Sabe-se que a atividade do NAc é pró-nociceptiva e que a analgesia
21 mediada pelo controle nociceptivo ascendente depende da inibição do NAc (Gear &
22 Levine, 2011), portanto, o aumento da expressão de c-Fos nos animais que
23 receberam apenas injeção de carragenina pode refletir o aumento da atividade do
24 NAc durante a hiperalgesia. Adicionalmente, a diminuição da expressão de c-Fos
25 nos animais que receberam injeção de capsaicina pode refletir a inibição do NAc
26 para induzir antinocicepção.

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

1 de c-Fos dentro do PAG e RVM em resposta a atividade nociceptiva (Han et al.,
2 2003; Keay & Bandler, 1993) ou analgesia endógena (Lloyd et al., 2007).

3 O NAc é um alvo crítico do sistema mesolímbico dopaminérgico que,
4 juntamente com seu papel bem conhecido em recompensa e motivação (Berridge &
5 Kringelbach, 2015), mostrou ter um papel importante na modulação da dor (para
6 excelentes revisões, veja (Baliki & Apkarian, 2015; Navratilova et al., 2015)). No
7 entanto, no panorama atual da literatura, o sistema descendente e o mesolímbico
8 parecem modular a dor através de mecanismos totalmente independentes, até o
9 ponto que revisões importantes em cada sistema, mal mencionam um ao outro
10 (Baliki & Apkarian, 2015; De Felice & Ossipov, 2016). De fato, embora a PAG esteja
11 anatomicamente conectada com a área tegmental ventral e ao NAc (Kirouac et al.,
12 2004; Suckow et al., 2013) e evidências da década de 90 que sugerem um loop
13 bidirecional opioide entre estes núcleos (Ma & Han, 1991; Ma et al., 1992; Yu & Han,
14 1990), até onde sabemos, esta é a primeira evidência que liga os sistemas
15 descendente e mesolímbico em um mecanismo endógeno de modulação da dor.
16 Recentemente, Baliki e Apkarian (Baliki & Apkarian, 2015) propuseram que a
17 experiência de dor aguda depende da transmissão nociceptiva periférica e de um
18 fenômeno de limiar, responsável por determinar quando a nocicepção se torna
19 perceptível como dor (Baliki & Apkarian, 2015). Este limiar entre dor e nocicepção
20 acredita-se ser dependente da atividade mesolímbica, porém a base mecanicista
21 subjacente não está clara. Os achados do presente estudo se encaixam bem como
22 um possível mecanismo neste cenário, porque o sistema descendente possui uma
23 poderosa capacidade de diminuir a transmissão nociceptiva, o que
24 consequentemente aumenta o limiar de percepção da dor. Evidentemente, estudos
25 adicionais são necessários para suportar essa ideia, bem como para determinar se o
26 sistema mesolímbico se conecta com o sistema descendente através de circuitos
27 corticais ou subcorticais.

28 Embora estudos prévios de imagem em cérebro humano tenham
29 correlacionado indiretamente a atividade da PAG com a analgesia em resposta a
30 alguns tipos de estimulação nociceptiva (Derbyshire & Osborn, 2009; Sprenger et al.,
31 2011; Yelle et al., 2009), até onde sabemos, este estudo é a primeira evidência
32 funcional que mostra que o sistema descendente PAG-RVM medeia a analgesia
33 induzida pela dor. Durante situações de ameaça à sobrevivência, os mecanismos de
34 modulação da dor são ativados de forma preventiva, garantindo que o sujeito fique

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

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

23

24

25

26

27

1 **8 CONCLUSÃO**

2

3

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

13

14

15

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

- 1 Gear, R. W., & Levine, J. D. (2009). Rostral ventral medulla cholinergic mechanism in
2 pain-induced analgesia. *Neurosci Lett*, *464*(3), 170-172. doi: S0304-
3 3940(09)01113-6 [pii]
4 10.1016/j.neulet.2009.08.036
- 5 Gear, R. W., & Levine, J. D. (2011). Nucleus accumbens facilitates nociception. *Exp*
6 *Neurol*, *229*(2), 502-506. doi: S0014-4886(11)00105-1 [pii]
7 10.1016/j.expneurol.2011.03.021
- 8 Han, F., Zhang, Y. F., & Li, Y. Q. (2003). Fos expression in tyrosine hydroxylase-
9 containing neurons in rat brainstem after visceral noxious stimulation: an
10 immunohistochemical study. *World J Gastroenterol*, *9*(5), 1045-1050.
- 11 Harris, J. A. (1996). Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their
12 role in the animal's defensive system. *J Physiol Paris*, *90*(1), 15-25.
- 13 Holden, J. E., Farah, E. N., & Jeong, Y. (2005). Stimulation of the lateral
14 hypothalamus produces antinociception mediated by 5-HT1A, 5-HT1B and 5-
15 HT3 receptors in the rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience*, *135*(4), 1255-
16 1268. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.023
- 17 Holmes, B. B., & Fujimoto, J. M. (1992). Naloxone and norbinaltorphimine
18 administered intracerebroventricularly antagonize spinal morphine-induced
19 antinociception in mice through the antianalgesic action of spinal dynorphin A
20 (1-17). *J Pharmacol Exp Ther*, *261*(1), 146-153.
- 21 Katz, N. (2002). The impact of pain management on quality of life. *J Pain Symptom*
22 *Manage*, *24*(1 Suppl), S38-47.
- 23 Keay, K. A., & Bandler, R. (1993). Deep and superficial noxious stimulation increases
24 Fos-like immunoreactivity in different regions of the midbrain periaqueductal
25 grey of the rat. *Neurosci Lett*, *154*(1-2), 23-26.
- 26 Kiefel, J. M., Rossi, G. C., & Bodnar, R. J. (1993). Medullary mu and delta opioid
27 receptors modulate mesencephalic morphine analgesia in rats. *Brain Res*,
28 *624*(1-2), 151-161.
- 29 Kirouac, G. J., Li, S., & Mabrouk, G. (2004). GABAergic projection from the ventral
30 tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the
31 dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, *469*(2), 170-184. doi:
32 10.1002/cne.11005
- 33 Lane, D. A., Patel, P. A., & Morgan, M. M. (2005). Evidence for an intrinsic
34 mechanism of antinociceptive tolerance within the ventrolateral periaqueductal
35 gray of rats. *Neuroscience*, *135*(1), 227-234. doi:
36 10.1016/j.neuroscience.2005.06.014
- 37 Lau, B. K., & Vaughan, C. W. (2014). Descending modulation of pain: the GABA
38 disinhibition hypothesis of analgesia. *Curr Opin Neurobiol*, *29*, 159-164. doi:
39 10.1016/j.conb.2014.07.010
- 40 Le Bars, D. (2002). The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive
41 neurones. *Brain Res Brain Res Rev*, *40*(1-3), 29-44.
- 42 Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception.
43 *Pharmacol Rev*, *53*(4), 597-652.
- 44 Loyd, D. R., Morgan, M. M., & Murphy, A. Z. (2007). Morphine preferentially activates
45 the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male
46 rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception.
47 *Neuroscience*, *147*(2), 456-468. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.03.053
- 48 Lux, F., Welch, S. P., Brase, D. A., & Dewey, W. L. (1988). Interaction of morphine
49 with intrathecally administered calcium and calcium antagonists: evidence for

- 1 supraspinal endogenous opioid mediation of intrathecal calcium-induced
2 antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 246(2), 500-507.
- 3 Ma, Q. P., & Han, J. S. (1991). Neurochemical studies on the mesolimbic circuitry of
4 antinociception. *Brain Res*, 566(1-2), 95-102.
- 5 Ma, Q. P., Shi, Y. S., & Han, J. S. (1992). Further studies on interactions between
6 periaqueductal gray, nucleus accumbens and habenula in antinociception.
7 *Brain Res*, 583(1-2), 292-295.
- 8 McCarberg, B. H., Nicholson, B. D., Todd, K. H., Palmer, T., & Penles, L. (2008). The
9 impact of pain on quality of life and the unmet needs of pain management:
10 results from pain sufferers and physicians participating in an Internet survey.
11 *Am J Ther*, 15(4), 312-320. doi: 10.1097/MJT.0b013e31818164f2
- 12 Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*,
13 150(3699), 971-979.
- 14 Meng, I. D., Johansen, J. P., Harasawa, I., & Fields, H. L. (2005). Kappa opioids
15 inhibit physiologically identified medullary pain modulating neurons and reduce
16 morphine antinociception. *J Neurophysiol*, 93(3), 1138-1144. doi:
17 10.1152/jn.00320.2004
- 18 Merskey, H., & Bogduk, N. (1994). *Classification of Chronic Pain: Descriptions of*
19 *Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms* (2 ed.). Seattle: IASP
20 Press.
- 21 Miaskowski, C., & Levine, J. D. (1992). Inhibition of spinal opioid analgesia by
22 supraspinal administration of selective opioid antagonists. *Brain Res*, 596(1-
23 2), 41-45. doi: 0006-8993(92)91530-R [pii]
- 24 Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66(6), 355-474.
- 25 Navratilova, E., Atcherley, C. W., & Porreca, F. (2015). Brain Circuits Encoding
26 Reward from Pain Relief. *Trends Neurosci*, 38(11), 741-750. doi:
27 10.1016/j.tins.2015.09.003
- 28 Nir, R. R., & Yarnitsky, D. (2015). Conditioned pain modulation. *Curr Opin Support*
29 *Palliat Care*, 9(2), 131-137. doi: 10.1097/SPC.000000000000126
- 30 Ossipov, M. H., Dussor, G. O., & Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. *J*
31 *Clin Invest*, 120(11), 3779-3787. doi: 10.1172/JCI43766
- 32 Ozdemir, E., Gursoy, S., & Bagcivan, I. (2012). The effects of
33 serotonin/norepinephrine reuptake inhibitors and serotonin receptor agonist on
34 morphine analgesia and tolerance in rats. *J Physiol Sci*, 62(4), 317-323. doi:
35 10.1007/s12576-012-0207-x
- 36 Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.).
37 New York: Academic Press.
- 38 Porreca, F., & Navratilova, E. (2017). Reward, motivation, and emotion of pain and
39 its relief. *Pain*, 158 Suppl 1, S43-S49. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000798
- 40 Pud, D., Granovsky, Y., & Yarnitsky, D. (2009). The methodology of experimentally
41 induced diffuse noxious inhibitory control (DNIC)-like effect in humans. *Pain*,
42 144(1-2), 16-19. doi: 10.1016/j.pain.2009.02.015
- 43 Randall, L. O., & Selitto, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity
44 on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 111(4), 409-419.
- 45 Schmidt, B. L., Tambeli, C. H., Barletta, J., Luo, L., Green, P., Levine, J. D., & Gear,
46 R. W. (2002a). Altered nucleus accumbens circuitry mediates pain-induced
47 antinociception in morphine-tolerant rats. *J Neurosci*, 22(15), 6773-6780. doi:
48 20026639
49 22/15/6773 [pii]

- 1 Schmidt, B. L., Tambeli, C. H., Gear, R. W., & Levine, J. D. (2001). Nicotine
2 withdrawal hyperalgesia and opioid-mediated analgesia depend on nicotine
3 receptors in nucleus accumbens. *Neuroscience*, *106*(1), 129-136. doi: S0306-
4 4522(01)00264-0 [pii]
- 5 Schmidt, B. L., Tambeli, C. H., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2002b). mu/delta
6 Cooperativity and opposing kappa-opioid effects in nucleus accumbens-
7 mediated antinociception in the rat. *Eur J Neurosci*, *15*(5), 861-868. doi: 1915
8 [pii]
- 9 Silva, J. R., Silva, M. L., & Prado, W. A. (2011). Analgesia induced by 2- or 100-Hz
10 electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the activation of
11 different descending pain inhibitory mechanisms. *J Pain*, *12*(1), 51-60. doi:
12 S1526-5900(10)00490-6 [pii]
13 10.1016/j.jpain.2010.04.008
- 14 Song, Z., Ansah, O. B., Meyerson, B. A., Pertovaara, A., & Linderoth, B. (2013).
15 Exploration of supraspinal mechanisms in effects of spinal cord stimulation:
16 role of the locus coeruleus. *Neuroscience*, *253*, 426-434. doi:
17 10.1016/j.neuroscience.2013.09.006
- 18 Sprenger, C., Bingel, U., & Buchel, C. (2011). Treating pain with pain: supraspinal
19 mechanisms of endogenous analgesia elicited by heterotopic noxious
20 conditioning stimulation. *Pain*, *152*(2), 428-439. doi:
21 10.1016/j.pain.2010.11.018
- 22 Suckow, S. K., Deichsel, E. L., Ingram, S. L., Morgan, M. M., & Aicher, S. A. (2013).
23 Columnar distribution of catecholaminergic neurons in the ventrolateral
24 periaqueductal gray and their relationship to efferent pathways. *Synapse*,
25 *67*(2), 94-108. doi: 10.1002/syn.21624
- 26 Tambeli, C. H., Fischer, L., Monaliza, S. L., Menescal-de-Oliveira, L., & Parada, C. A.
27 (2012). The functional role of ascending nociceptive control in defensive
28 behavior. *Brain Res*, *1464*, 24-29. doi: 10.1016/j.brainres.2012.05.010
- 29 Tambeli, C. H., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2009). Centralization of noxious
30 stimulus-induced analgesia (NSIA) is related to activity at inhibitory synapses
31 in the spinal cord. *Pain*, *143*(3), 228-232. doi: S0304-3959(09)00154-7 [pii]
32 10.1016/j.pain.2009.03.005
- 33 Tambeli, C. H., Parada, C. A., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2002). Inhibition of tonic
34 spinal glutamatergic activity induces antinociception in the rat. *Eur J Neurosci*,
35 *16*(8), 1547-1553. doi: 2204 [pii]
- 36 Tambeli, C. H., Quang, P., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2003a). Contribution of
37 spinal inhibitory receptors in heterosegmental antinociception induced by
38 noxious stimulation. *Eur J Neurosci*, *18*(11), 2999-3006. doi: 3031 [pii]
- 39 Tambeli, C. H., Young, A., Levine, J. D., & Gear, R. W. (2003b). Contribution of
40 spinal glutamatergic mechanisms in heterosegmental antinociception induced
41 by noxious stimulation. *Pain*, *106*(1-2), 173-179. doi: S0304395903003324
42 [pii]
- 43 Tobaldini, G., Aisengart, B., Lima, M. M., Tambeli, C. H., & Fischer, L. (2014).
44 Ascending nociceptive control contributes to the antinociceptive effect of
45 acupuncture in a rat model of acute pain. *J Pain*, *15*(4), 422-434. doi:
46 10.1016/j.jpain.2013.12.008
- 47 Tomim, D. H., Pontarolla, F. M., Bertolini, J. F., Arase, M., Tobaldini, G., Lima, M. M.,
48 & Fischer, L. (2016). The Pronociceptive Effect of Paradoxical Sleep
49 Deprivation in Rats: Evidence for a Role of Descending Pain Modulation

- 1 Mechanisms. *Mol Neurobiol*, 53(3), 1706-1717. doi: 10.1007/s12035-014-
2 9059-0
- 3 Vaughan, C. W., Ingram, S. L., Connor, M. A., & Christie, M. J. (1997). How opioids
4 inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*, 390(6660), 611-614. doi:
5 10.1038/37610
- 6 Viisanen, H., Ansah, O. B., & Pertovaara, A. (2012). The role of the dopamine D2
7 receptor in descending control of pain induced by motor cortex stimulation in
8 the neuropathic rat. *Brain Res Bull*, 89(3-4), 133-143. doi:
9 10.1016/j.brainresbull.2012.08.002
- 10 Welch, S. P., Stevens, D. L., & Dewey, W. L. (1992). A proposed mechanism of
11 action for the antinociceptive effect of intrathecally administered calcium in the
12 mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 260(1), 117-127.
- 13 Yaksh, T. L., Yeung, J. C., & Rudy, T. A. (1976). Systematic examination in the rat of
14 brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of
15 differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Res*, 114(1), 83-103.
- 16 Yelle, M. D., Oshiro, Y., Kraft, R. A., & Coghill, R. C. (2009). Temporal filtering of
17 nociceptive information by dynamic activation of endogenous pain modulatory
18 systems. *J Neurosci*, 29(33), 10264-10271. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4648-
19 08.2009
- 20 Yu, L. C., & Han, J. S. (1990). Habenula as a relay in the descending pathway from
21 nucleus accumbens to periaqueductal grey subserving antinociception. *Int J*
22 *Neurosci*, 54(3-4), 245-251.
- 23 Zhao, Z. Q. (2008). Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Prog*
24 *Neurobiol*, 85(4), 355-375. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.004
25
26
27