



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS CONVÊNIO UFSCar/UNESP



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA

**Papel da Anandamida na modulação supraespinal da nociceção e da
antinociceção induzida pelo estresse de derrota social.**

Diego Cardozo Mascarenhas

Araraquara – SP

-2017-

Diego Cardozo Mascarenhas

**Papel da Anandamida na modulação supraespinal da nocicepção e da
antinocicepção induzida pelo estresse de derrota social.**

*Tese apresentada ao Programa
Interinstitucional de Ciências Fisiológicas
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Ciências Fisiológicas.*

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Araraquara – SP

-2017-



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Diego Cardozo Mascarenhas, realizada em 22/09/2017:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi
USP

Prof. Dr. Fábio Cardozo Cruz
UNIFESP

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta
UNESP

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

*Dedico esse trabalho ao Carlos, meu amor e
companheiro, sem o qual o mesmo não teria
sido realizado, e também à minha família
pelo alicerce provido nas esferas éticas e
morais sem contar o suporte financeiro,
afetivo e edificador de sempre.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a força teísta que me impulsiona, e que, apesar de ainda ser um mistério pra mim, certamente me ajudou nesses anos.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza pelo excepcional esforço em formar cientistas no seu laboratório e pela amizade construída ao longo de quase uma década de colaborações e ensinamentos. Um exemplo de ética na profissão e também como pessoa e pai de família. Muito obrigado por tudo!

Agradeço a Dra. Karina Santos Gomes, pelo imensurável ensinamento, colaboração e, sobretudo, amizade. A Karina fez com que eu realmente gostasse de pesquisa e mesmo a distância contribuiu significativamente para esse trabalho.

À banca examinadora pela solicitude em ler e contribuir com esse trabalho.

À banca da qualificação, cujas sugestões foram de grande valia para o trabalho.

Ao amor da minha vida, Carlos, cuja parceria e apoio me trouxe até esse momento. Certamente a caminhada foi mais leve ao seu lado, os problemas divididos e as alegrias somadas. Eu te amo infinitamente.

Aos meus familiares, minha mãe Maria das Graças, meu pai Luiz Alberto, minha irmã Daniele, e meu cunhado Daniel Cambiaghi por estarem sempre presentes e por terem construído em mim um alicerce forte, além de terem mostrado que não há nada mais importante do que a família.

A todos os outros familiares tios, tias, primos, primas e avós pelo apoio e por todo o amor dedicado. Aqui em especial, um agradecimento ao meu avô Antônio Cardozo e seu filho Sebastião Geraldo Cardozo que partiram deixando saudades e muito orgulho.

À família do Carlos, dona Idalina, Antônio (Toninho) e Carlos Alexandre, que escolhi para ser minha família também e que me acolheram como um dos seus e pelos quais tenho profundo amor e gratidão.

Agradeço também, especialmente, minha segunda mãe Vania e meu segundo pai José Luiz, por serem os melhores padrinhos que eu poderia ter.

A Prof. Dra. Cleopatra, Prof. Dr. Carlos e Prof. Dr. Marcelo pela amizade e apoio durante esses anos no laboratório de farmacologia.

Às técnicas do laboratório, Elizabete e Rosana que já gozam de suas aposentadorias e a recente técnica Valéria, além da secretária Tirene, pela amizade e excepcional dedicação aos alunos da farmacologia, sem as quais esse trabalho não teria sido concluído. Sinto-me privilegiado de poder contar com essas excelentes profissionais!

Aos amigos Ana Claudia, Tarciso, Tatiani, Maria Adrielle, Matheus (Capiau), William, Lucas Gomes, Lucas Canto, Lucas Barreto (Debi), Nathália (Bang), Jonas, Marion, Gabriel, Ricardo, Leandro, Gessynger, Celina, Jeferson, Johnny, Rodrigo, Vanessa, Josiane, Ligia, Fábio (Quasy), Paula (Pupu), Karine, Sheila, Paulo, Rodrigo (Vampeta), Paola, Fer Daher, Ligia (Azair), Aura e Daniela pelo apoio em qualquer tipo de situação, companhia, risadas e descontração durante a convivência diária no laboratório. To Jovana Petrovick for the friendship built in the few months she spent here with us, not to mention the exchange of cultural aspects between Brazilians and Serbs. Thank you very much!

Aos meus queridos alunos que realizaram seus TCCs no nosso laboratório, os quais tive o privilégio de coorientar; Guilherme Tinoco, Daniela Pereira, Alice Gallo, Vinicius Costa, Isabella Marion. É orientando que se aprende conceitos, fundamenta a base teórica, aprende a lidar com pessoas, distingue o papel de ser um líder em detrimento de ser um chefe, contribuiu com a formação dos alunos, enfim, acho que meus alunos me beneficiaram mais do que eu beneficiei a eles.

A Cristiane Feriato da Silva e Josiane Canaã por todo ensinamento e amizade construídos desde a época da Farmácia Escola. Foi um privilégio poder trabalhar com essas excelentes profissionais farmacêuticas!

Aos colegas de profissão, Azair, Rimenez, Eduardo, Patrícia de Paula, Laurival, Chico e Nilva pela descontração e amizade.

A Cláudia (UNESP) e ao Alexandre (UFSCar), secretários do PIPGCF, pela excelente assistência prestada.

Aos funcionários da FCFar/UNESP pelo apoio prestado durante o projeto, em especial aos funcionários do Biotério e da Seção de Transportes.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À FCF/Ar/UNESP, pelo espaço físico e as condições laboratoriais, necessários para realização adequada desse projeto.

Ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, pela ótima estrutura e por viabilizar a realização desse projeto de doutorado.

Ao PADC/FCF/Ar, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro concedido, o qual foi de suma importância na realização do projeto.

Aos camundongos utilizados neste projeto, cujas vidas contribuíram para o avanço da ciência.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sensibilização do canal TRPV1 pela anandamida (AEA).....	31
Figura 2: linha do tempo do Experimento 1.....	41
Figura 3: linha do tempo do Experimento 2.....	42
Figura 4: linha do tempo do Experimento 3.....	43
Figura 5: linha do tempo do Experimento 4.....	44
Figura 6: Representação esquemática e fotomicrografia da SCP.....	49
Figura 7: Efeito da microinjeção de anandamida intra-SCPd.....	50
Figura 8: Efeito da microinjeção de capsaicina intra-SCPd.....	51
Figura 9: Efeito da microinjeção de WIN intra-SCPd.....	52
Figura 10: Efeito da microinjeção de AM251 intra-SCPd.....	53
Figura 11: Efeito da microinjeção de 6-iodo intra-SCPd.....	54
Figura 12: Efeito da microinjeção de capsazepina intra-SCPd.....	55
Figura 13: Efeito da microinjeção de CsA intra-SCPd.....	56
Figura 14: Efeito da microinjeção de AM251 + anandamida intra-SCPd.....	57
Figura 15: Efeito da microinjeção de 6-iodo + anandamida intra-SCPd.....	58
Figura 16: Efeito da microinjeção de capsazepina ou AM251 intra-SCPd na AIE de derrota social.....	59
Figura 17: Efeito da microinjeção de AM251 + CsA intra-SCPd na AIE de derrota social.....	61
Figura 18: Efeito da microinjeção de AM251/6-iodo + CsA intra-SCPd na AIE de derrota social.....	62

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Reações de defesa.....	16
1.2. Dor.....	17
1.2.1. Conceitos e Neurofisiologia.....	17
1.3. Sistema Inibitório Descendente.....	20
1.3.1. Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP).....	23
1.3.1.1. Organização anatômica e funcional da SCP.....	23
1.4. Antinocicepção induzida por estímulos aversivos.....	24
1.4.1. Estresse de Derrota Social.....	25
1.4.2. Teste de retirada da cauda.....	26
1.5. Neuroquímica das reações de defesa e os receptores vaniloides.....	27
1.6. Vaniloides/Canabinoides na modulação da dor.....	29
1.7. Sensibilidade dos TRPV1 à Anandamida.....	30
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Sujeitos.....	36
3.2. Fármacos.....	36
3.3. Cirurgia e administração intra-SCPd de fármacos.....	37

3.4. Teste de retirada da cauda (<i>tail-flick</i>).....	38
3.5. Estresse de derrota social.....	39
3.6. Procedimentos.....	40
3.7. Histologia.....	44
3.8. Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Histologia.....	47
4.2. Experimento 1A.....	50
4.3. Experimento 1B.....	51
4.4. Experimento 1C.....	52
4.5. Experimento 1D.....	53
4.6. Experimento 1E.....	54
4.7. Experimento 1F.....	55
4.8. Experimento 1G.....	56
4.9. Experimento 2A.....	57
4.10. Experimento 2B.....	58
4.11. Experimento 3.....	59
4.12. Experimento 4A.....	60
4.13. Experimento 4B.....	61
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMO

A Anandamida (AEA), considerada inicialmente um endocanabinoide, foi recentemente descrita como agonista vaniloide capaz de modular a dor aguda em regiões como a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Neste sentido, o papel da AEA na dor é complexo, uma vez que a estimulação dos TRPV1 (do inglês: *transient receptor potential vanilloid type 1*) e dos CB1 (receptores canabínicos tipo 1) levou a efeitos paradoxais na nocicepção. Ainda, o estresse agudo, como a derrota social, libera este composto na SCP, tornando relevante sua implicação no fenômeno da antinocicepção induzida pelo estresse. Finalmente, o estado de fosforilação dos TRPV1 influencia sua sensibilidade à AEA, sendo este um possível mecanismo responsável pela potência e/ou duração da antinocicepção induzida por estresse dependente de AEA. Aqui, tentamos vetorizar a AEA exógena em diferentes receptores (i.e. TRPV1 ou CB1) na SCP dorsal (SCPd) de camundongos a fim de alcançar a antinocicepção, além de elucidar as implicações da AEA endógena local na antinocicepção induzida pela derrota social. O teste de retirada da cauda foi escolhido para avaliar a dor aguda. Desta forma, este agonista CB1/TRPV1 injetado na SPCd de camundongos não alterou a nocicepção. Em contraste, a injeção local de WIN e capsaicina induziram um efeito antinociceptivo dependente de CB1 e TRPV1 em camundongos, respectivamente. Interessantemente, apenas sob bloqueio de CB1 na SCPd de camundongos, a AEA local revelou um perfil antinociceptivo claro, sugerindo um papel proeminente deste composto quando ligado seletivamente nos receptores TRPV1. Em termos de antinocicepção induzida por derrota social, o bloqueio intra-SCPd de TRPV1 ou CB1 atenuou a antinocicepção induzida pelo estresse. Finalmente, a injeção intra-SCPd de ciclosporina A (CsA - uma droga que mantém os TRPV1 fosforilados, ou seja, sensíveis aos endovaniloides) potencializou e prolongou a antinocicepção induzida por derrota social, sugerindo que esse mecanismo de fosforilação é fundamental para a expressão da antinocicepção via TRPV1. Em conclusão, parece que a vetorização da AEA

nos substratos vaniloides é uma ferramenta interessante para abordar a dor aguda e talvez a ciência translacional. Além disso, a antinocicepção induzida pela derrota social (i) parece estar sujeita a uma modulação parcial vaniloide/canabinoide e (ii) sua magnitude e tempo de duração dependem da fosforilação de TRPV1.

ABSTRACT

Anandamide (AEA), initially considered an endocannabinoid, has recently been described as a vanilloid agonist capable of modulating acute pain in brain regions such as the periaqueductal gray (PAG). In this context, AEA role in pain management is complex, since TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) and CB1 (cannabinoid receptors type 1) stimulation led to paradoxical effects on nociception. Moreover, acute stress, such as the social defeat, releases this compound into the PAG, making relevant its implication in the stress-induced antinociception phenomenon. Finally, the phosphorylation status of TRPV1 influences its sensitivity to AEA, which is a possible mechanism responsible for the potency and/or time length of AEA-dependent stress-induced antinociception. Herein, we have attempted to vector exogenous AEA to different receptors (i.e., TRPV1 or CB1) into mice dorsal PAG (dPAG) to reach antinociception; in addition present study aimed at elucidating the implications of local endogenous AEA in the social defeat-induced antinociception. The tail-flick test was chosen to assess acute pain. Accordingly, this CB1/TRPV1 agonist injected into mice dPAG did not change nociception. In contrast, local injections of WIN and capsaicin induced a marked CB1- and TRPV1-dependent antinociceptive effect in mice, respectively. Interestingly, only under cannabinoid blockade within mice dPAG, local AEA revealed a clear antinociceptive profile, suggesting a prominent role of this compound when it selectively binds with TRPV1. In terms of social defeat-induced antinociception, intra-dPAG blockade of either TRPV1 or CB1 attenuated the high magnitude stress-induced antinociception. Finally, intra-dPAG injections of cyclosporine A (CsA – a drug that renders TRPV1 phosphorylated, i.e., sensitive to endovanilloids) potentiated and prolonged the social defeat-induced antinociception suggesting that this mechanism of phosphorylation is pivotal to the expression of antinociception via vanilloid substrates. In conclusion, it seems that vectoring AEA to the vanilloid substrate

is an interesting tool to address acute pain and perhaps translational science. Moreover, the social defeat-induced antinociception (i) seems to be subjected to a partial vanilloid/cannabinoid modulation and (ii) its magnitude and time length depend on the TRPV1 phosphorylation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. REAÇÕES DE DEFESA

Historicamente, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade teve início nos relatos de Darwin em sua obra “A expressão das emoções no homem e nos animais”, a qual apontou o caminho, seguido em nosso século pela Etologia, de buscar o valor adaptativo dos processos comportamentais e psicológicos. “*O homem tendo outros animais como ancestrais compartilha com estes suas emoções básicas*” (Darwin, 1902).

Do ponto de vista evolucionário, o medo e a ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e que se originam nas reações de defesa que os animais exibem diante de ameaças que podem comprometer sua integridade física ou a própria sobrevivência (Deakin e Graeff, 1991). O homem compartilha com os animais essas emoções básicas (Zangrossi e Graeff, 2004), de modo que, segundo Schmitt e Kapezinski (2004), a ansiedade pode ser apontada como uma emoção responsável pela sobrevivência da espécie humana (Schmitt e Kapezinski, 2004).

Medo e ansiedade são emoções correlacionadas, qualificadas subjetivamente como não prazerosas e desagradáveis, acompanhadas por um conjunto de alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivo-subjetivas (Graeff, 1990). Em determinadas situações, os estados de medo e ansiedade podem também influenciar a magnitude da resposta do indivíduo a estímulos nociceptivos, acarretando em hiper (Maione *et al.*, 2006; Cornelio *et al.*, 2011) ou hiponocicepção (Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2005; Cornelio e Nunes-De-Souza, 2009; Mascarenhas *et al.*, 2015). A diminuição da resposta nociceptiva ou antinocicepção desencadeada por situações de estresse ou de perigo tem sido amplamente investigada em vários laboratórios (por ex, Miczek *et al.*, 1986; Siegfried *et al.*, 1990; Hohmann *et al.*, 2005; Suplita *et al.*, 2005; Maione *et al.*, 2006). Neste sentido, apesar de a dor ser uma sensação importante para a manutenção da vida de muitos animais, quando esses são confrontados com ameaças ao seu bem-estar, à

integridade física ou à sobrevivência, além de exibirem respostas comportamentais (fuga, luta, congelamento, vocalização), neurovegetativas (taquicardia, hipertensão, defecação) e neuroendócrinas (secreção de corticosterona), normalmente apresentam diminuição da sensibilidade dolorosa ou antinocicepção (para revisão ver, Rodgers, 1995; Millan, 1999). Diante de tais situações, a antinocicepção apresenta claro valor adaptativo, pois permite ao animal exibir reações defensivas tais como congelamento, luta e fuga, mesmo que uma injúria tenha ocorrido, aumentando assim, suas chances de sobrevivência (Bolles e Fanselow, 1980). Neste contexto, a antinocicepção é considerada como parte do repertório de reações de defesa e, portanto, a investigação de seus mecanismos subjacentes tem relevância para a compreensão da neurobiologia dos estados de medo/ansiedade.

1.2. DOR

1.2.1. CONCEITOS E NEUROFISIOLOGIA

A palavra dor é utilizada para descrever uma variedade muito ampla de sensações e experiências emocionais associadas, desde uma injúria sofrida em decorrência de um corte ou de uma pequena queimadura, até as sensações anormais das síndromes neuropáticas (Cervero, 2000). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (1979), a dor pode ser definida como uma “experiência emocional e sensorial desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão” (Bond, 2006). Entretanto, a dor tem um significado individual e sofre influência de experiências anteriores que não envolvem somente a transdução de estímulos nocivos, mas também de seu processamento cognitivo e emocional (Julius e Basbaum, 2001; Almeida *et al.*, 2004). Sendo assim, existem mecanismos modulatórios

atuando em regiões como as terminações nervosas livres, o corno dorsal da medula espinal e em estruturas supraespinais (Millan, 1999).

Em face dessas evidências, a dor não pode ser entendida como um simples fenômeno sensitivo. Dessa forma, a dor tem sido considerada como consistindo de dois principais componentes: o perceptivo-discriminativo, que permite ao indivíduo reconhecer o estímulo como doloroso e localizá-lo numa determinada região do corpo, e o aversivo-cognitivo-motivacional, que compreende uma série de respostas defensivas que vão desde a retirada de um membro até respostas emocionais complexas como a luta e a fuga, visando a autopreservação imediata (Basbaum e Fields, 1978).

Sucintamente, os mecanismos neurofisiológicos da dor incluem a ativação de receptores fisiológicos, denominados nociceptores, amplamente encontrados na pele, mucosas, membranas, tecidos conjuntivos de órgãos viscerais, ligamentos e cápsulas articulares (Almeida *et al.*, 2004). Os receptores correspondem a terminações nervosas livres e representam a parte mais distal de um neurônio aferente de primeira ordem (Tillman *et al.*, 1995; Slugg *et al.*, 2000). As fibras dos neurônios aferentes primários podem ser classificadas com base em seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução: fibras do tipo A δ , dentre as mielinizadas, a mais fina (2-6 μ m de diâmetro) e rápidas condutoras de sinais nociceptivos (12-30 m/s) e fibras do tipo C, amielínicas, mais finas (0,4-1,2 μ m de diâmetro) e de condução mais lenta (0,5-2,0 m/s). Enquanto a ativação do primeiro tipo de fibra está associada à sensação de dor descrita como cortante e bem localizada, a ativação de fibras do tipo C promove uma sensação de queimação e sem localização precisa (Le Bars *et al.*, 2001).

Uma série de eventos influencia o processamento da dor. Dentre eles, a interação entre receptor e neurotransmissor nas sinapses presentes no corno dorsal da medula espinal tem recebido destaque. A conexão entre as fibras aferentes primárias e os

neurônios de segunda ordem envolve a liberação de vários neurotransmissores, dentre eles, glutamato, substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) (Baumann; Strickland, 2008). Após interações diretas ou indiretas com neurônios de projeção do corno dorsal da medula espinal, os axônios de neurônios de segunda ordem constituem fascículos que formam feixes ou vias que transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas encefálicas como substância cinzenta periaquedutal (SCP), formação reticular, hipotálamo, tálamo e complexo amigdalóide (Brooks; Tracey, 2005; Millan, 1999). Dessa forma, após uma lesão, a dor é transmitida até o corno dorsal através das fibras aferentes primárias, de onde é conduzida até o encéfalo através de vias ascendentes (Mello; Dickenson, 2008).

As vias ascendentes, que apesar de complexas, podem ser resumidas em: trato espinotalâmico, trato espinomesencefálico, trato espinoparabraquial, trato espinohipotalâmico e trato espinoreticular (para uma revisão ver Millan, 1999).

O trato espinotalâmico consiste na via ascendente nociceptiva mais proeminente na medula espinal, na qual estão compreendidos neurônios nociceptivos específicos e de faixa dinâmica ampla das lâminas I, V e VI do corno dorsal. Esses axônios projetam-se para o lado contralateral da medula espinal e ascendem pelo sistema ântero-lateral, até regiões talâmicas, de onde se projetam até o córtex onde ocorre a percepção nociceptiva. A estimulação elétrica do trato espinotalâmico resulta em sensação de dor, enquanto a lesão dessas fibras (processo conhecido como cordotomia ântero-lateral) resulta em marcante redução na sensibilidade à dor no lado oposto ao da lesão. O trato espinomesencefálico compreende axônios de neurônios originados nas lâminas I e V. As projeções percorrem o quadrante ântero-lateral da medula espinal e terminam na formação reticular mesencefálica, substância cinzenta periaquedutal (via trato espinotectal) e camadas profundas do colículo superior (via trato espinotectal). O maior

alvo do trato espinomesencefálico é o núcleo parabraquial (PB) da ponte, uma região que exerce um papel importante na integração das respostas autonômicas, cardiovasculares e motivacionais a dor.

O trato espinorreticular compreende neurônios que se originam nas lâminas VII e VIII, que ascendem no quadrante ântero-lateral da medula espinal e terminam em estações sinápticas de diversos núcleos da formação reticular da medula e ponte, hipotálamo e tálamo.

Estudos de marcação retrógrada demonstraram a existência de projeções da medula espinal para o hipotálamo (Burstein et al, 1996). O trato espinohipotálâmico é composto de fibras de neurônios que ascendem contralateralmente para inervar o tálamo e hipotálamo. No entanto, projeções colaterais são também enviadas para a região do quiasma óptico, na qual decussam e descendem para inervar o hipotálamo ipsilateralmente. Há também projeções para outras regiões prosencefálicas (ex. núcleo septal, pálido e núcleo acumbente), tálamo e regiões límbicas, como amígdala, septo e estriado (Millan, 1999; Craig; Dostrovsky, 2001).

Enquanto mecanismos ascendentes processam a transmissão da dor para estruturas superiores do sistema nervoso central (SNC), vias inibitórias descendentes seguem o percurso oposto e levam a inibição da nocicepção em nível medular. O estudo dos mecanismos supramedulares e medulares envolvidos na inibição da dor tem sido de elevado interesse desde a descoberta de que a ativação de estruturas límbicas, como a SCP, leva a atenuação da nocicepção.

1.3. SISTEMA INIBITÓRIO DESCENDENTE

A relação entre a intensidade da dor e o estímulo periférico que a evoca depende de inúmeras variáveis que incluem a presença de outro estímulo somático e fatores

psicológicos como atenção, expectativa e alerta. Estes fatores psicológicos em questão são influenciados por dicas contextuais que ditam a significância do estímulo e ajudam a determinar uma resposta apropriada. Por exemplo, indivíduos que sofreram alguma injúria traumática durante competições ou combates frequentemente relatam ausência de dor, apesar dessa mesma injúria ser extremamente dolorosa em outras circunstâncias. A modificação da resposta neural, comportamental e subjetiva da dor por estímulos sensoriais concomitantes e por situações de alerta, expectativa e atenção resulta na ativação de redes no sistema nervoso central que modulam a transmissão nociceptiva (Fields; Basbaum; Heinricher, 2006).

Deste modo, em certas condições, tanto a dor como a sua ameaça pode eliciar diferentes respostas comportamentais, endócrinas (secreção de corticosterona) e ativação simpática (taquicardia e hipertensão) que, juntas com a resposta de antinocicepção transitória, melhoram o desempenho do repertório comportamental, permitindo o sucesso frente a encontros agressivos (ex., numa interação presa *vs* predador) e outras situações que ameace a integridade do indivíduo (Millan, 1999). O sistema de modulação da dor foi proposto primeiramente por Head e Holmes no início de 1911, entretanto, a existência de um sistema específico modulatório da dor foi discutido em detalhes em 1965, por Melzack e Wall (Melzack; Wall, 1965 *apud* Fields; Basbaum; Heinricher, 2006).

O mecanismo supracitado faz parte das vias inibitórias descendentes, onde o sistema defensivo é ativado frente a situações de estresse ou medo, o que permite ao animal exibir respostas defensivas ao invés de gastar seu tempo com comportamentos recuperativos, promovendo um aumento nas chances de sobrevivência. Neste sentido, segundo Bolles e Fanselow (1980) a inibição da resposta nociceptiva é de fundamental importância para a sobrevivência do indivíduo (Bolles; Fanselow, 1980 *apud* Harris, 1996).

O sistema inibitório descendente tem como estrutura essencial a substância cinzenta periaquedutal (SCP). A estimulação dessa área em animais produz analgesia, enquanto as respostas a outros estímulos ambientais (alerta e atenção) permanecem intactas. Entretanto, estão ausentes as respostas esperadas com aplicação de estímulos nocivos como orientação, vocalização e fuga. Esse mesmo efeito observado em animais também pode ser observado em pacientes com dores crônicas, onde a estimulação da SCP produz analgesia sem que ocorra qualquer outro tipo de resposta defensiva, como, por exemplo, a fuga. A descoberta desse papel da SCP foi de grande valor para o avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos na modulação da dor (Fields; Basbaum; Heinricher, 2006). Corroborando as citações acima, pesquisas vêm demonstrando que a SCP faz parte de um circuito do sistema nervoso central (SNC) que controla a transmissão nociceptiva processada na medula espinal (Fields; Heinricher; Mason, 1991).

Neste sentido, neurônios do corno dorsal da medula espinal são inibidos pela estimulação dessa estrutura, e lesões no funículo dorso lateral bloqueiam a inibição do SNC sobre neurônios do corno dorsal e respostas reflexas nocifensivas. Entretanto, além da SCP, diferentes áreas (amígdala, hipotálamo, *locus coeruleus* e núcleo magno da rafe) podem ser ativadas tanto por medo inato (p. ex., predador) ou medo apreendido, levando o animal a exibir diferentes respostas comportamentais, autonômicas bem como a redução da sensibilidade à dor (Fields; Basbaum; Heinricher, 2006; Harris, 1996; Lester; Fanselow, 1985; Kavaliers, 1988). Reynolds (1969) corroborou estas evidências através da descoberta da analgesia produzida por estimulação de estruturas encefálicas, que desencadeava uma supressão específica de comportamentos eliciados por estímulos nocivos.

Vários estudos foram conduzidos com o propósito de investigar os mecanismos envolvidos na modulação da transmissão nociceptiva no SNC. Grande parte deles tem

destacado a participação da SCP, colocando-a como pertencente ao sistema inibitório descendente, uma vez que sua estimulação resulta na interrupção da transmissão nociceptiva do corno dorsal da medula espinal (para uma revisão ver Fields; Basbaum; Heinricher, 2006).

1.3.1. SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (SCP)

As reações de defesa são orquestradas pelo sistema encefálico de defesa e processadas por regiões encefálicas tais como a amígdala, o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (SCP). A SCP vem ganhando destaque no estudo do processamento da informação dolorosa pelo fato de projetar sinapses excitatórias para o bulbo rostro ventromedial (RVM), que por sua vez manda projeções inibitórias para o corno dorsal da medula espinal, inibindo os feixes ascendentes que levam a informação da percepção dolorosa para estruturas supraespinais, participando, assim, de maneira importante no sistema inibitório descendente (para uma revisão ver Basbaum; Fields, 1984; Fields; Basbaum; Heinricher, 2006).

1.3.1.1. ORGANIZAÇÃO ANATÔMICA E FUNCIONAL DA SCP

A SCP é uma estrutura que circunda o aqueduto mesencefálico, sendo dividida anatômica e funcionalmente ao longo do eixo rostrocaudal em quatro colunas, denominadas de acordo com a posição em relação ao aqueduto, em dorsomedial (SCP_{dm}), dorsolateral (SCP_{dl}), lateral (SCP_l) e ventrolateral (SCP_{vl}) (Carrive, 1993; Bandler; Shipley, 1994).

A localização neuroanatômica e as abundantes conexões aferentes e eferentes favorecem a participação da SCP em vários sistemas ascendentes e trajetões descendentes (Manthey, 1982; Beitz, 1990), sendo considerada uma estrutura encefálica de alta

complexidade. De fato, a SCP recebe aferências e envia eferências a diferentes áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (Beitz, 1990; Bandler; de Paulis, 1991; Canteras, 2002; Sowards; Sowards, 2002). Tal condição sugere que essa estrutura esteja interligada a um elevado número de circuitos neurais responsáveis pela modulação e coordenação de muitas funções fundamentais para a sobrevivência do organismo, tais como a modulação de reações de defesa relacionadas ao medo e a ansiedade, processamento de informação dolorosa, controle motor e cardiovascular (para uma revisão ver Behbehani, 1995).

1.4. ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ESTÍMULOS AVERSIVOS

A assim conhecida *antinocicepção induzida por estímulos aversivos* pode ser provocada por estímulos que predizem o perigo, tanto de natureza aprendida quanto inata, além de estímulos estressores. Por exemplo, Rodgers e Randall (1986) demonstraram a ocorrência de analgesia condicionada em camundongos expostos a um contexto aonde haviam sido previamente atacados em interações intra-específicas. Por outro lado, a antinocicepção induzida por estímulos inatos de perigo pode ser evidenciada quando o animal é exposto a um predador (Lester; Fanselow, 1985; Kavaliers, 1988), a um novo ambiente (Netto; Siegfried; Izquierdo, 1987; Torres et al., 2001), ou a uma situação de perigo potencial, como o labirinto em cruz elevado (LCE – Rodgers; Lee; Shepherd, 1992; Lee; Rodgers, 1991), um teste de animal de ansiedade que se baseia na aversão natural de roedores a espaços abertos (ex., Pellow et al., 1985), bem como durante encontros agonísticos coespecíficos (Miczek; Thompson; Shuster, 1982; Siegfried; Frischknecht; Nunes-de-Souza, 1990, Komatsu et al., 2011).

É sabido que o estresse agudo suprime a dor pela ativação de vias neurais que envolvem mecanismos opioides e não opioides. Hohmann (2005) mostrou que o estresse

de choque na pata eliciou uma antinocicepção induzida pelo estresse (AIE) do tipo não opioide, mediado pela liberação de endocanabinoides no encéfalo de ratos. O modelo de choque na pata consiste numa forma de estresse que não simula uma situação natural, uma vez que os animais não se deparam naturalmente com essa situação. Nesse sentido, o modelo de derrota social, no qual a exposição de um animal a um agressor coespecífico, apresenta características etológicas e se mostra uma interessante ferramenta como forma de estresse capaz de ativar o sistema de AIE.

1.4.1. ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

O modelo de derrota social destaca-se por se tratar de um conflito entre coespecíficos, no qual um animal dominante residente ataca um intruso, resultando na exibição de diversos comportamentos defensivos no animal agredido. Primeiramente descrito por Yen e colaboradores (1959), esse procedimento tornou-se amplamente utilizado para o estudo da neurobiologia da agressão (para uma revisão ver Miczek et al., 1994; Siegfried; Frischknecht; Nunes-de-Souza, 1990) e das consequências do estresse crônico sobre vários parâmetros comportamentais, fisiológicos, farmacológicos e moleculares (por ex. Zelena et al., 1999; Krishnan et al., 2007). Devido às alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas induzidas pela derrota social, tem-se proposto este modelo como sendo válido para o estudo de desordens comportamentais, tais como depressão, abuso de drogas e ansiedade social (Stein; Bouwer, 1997; Keeney; Hogg, 1999; Laviola et al., 1999; Björkqvist, 2001). A partir de estudos realizados por Miczek e colaboradores (1982), mostrando uma diminuição da nocicepção em camundongos expostos a repetidos ataques de um coespecífico (Miczek; Thompson; Shuster, 1982), houve um aumento no número de trabalhos preocupados em explorar o modelo da derrota social na AIE (Teskey; Kavaliers, 1987; Miczek et al., 1986; Thompson et al., 1988;

Siegfried; Frischknecht; Nunes-de-Souza, 1990; Komatsu et al., 2011). Porém, ainda não há evidências da utilização desse modelo na investigação do papel do sistema canabinoide/vaniloide na AIE.

1.4.2. TESTE DE RETIRADA DA CAUDA

A AIE de derrota social pode ser investigada através de vários testes de nocicepção. Nesse contexto, destaca-se o teste da retirada da cauda, ou *tail-flick*, que consiste na aplicação de um estímulo nociceptivo térmico na cauda, gerando um reflexo espinal com conseqüente flexão da cauda. Este teste pode ser aplicado de duas diferentes formas, a primeira consiste na radiação de energia térmica na cauda do animal e posterior medida da latência de retirada da cauda (LRC); a segunda forma consiste na imersão da cauda do animal em água quente e posterior análise da LRC (Le Bars et al., 2001). Tal como acontece com todos os reflexos, ele está sujeito ao controle de estruturas supraespinais (Mitchell; Hellon, 1977). De um ponto de vista farmacológico, há um consenso de que este teste é eficiente para revelar a atividade de analgésicos opioides. Neste contexto, é adequado como teste preditivo para avaliar os efeitos de fármacos analgésicos para humanos (Archer; Harris, 1965; Grumbach, 1966). Pesquisadores também já mostraram que o teste do *tail-flick* (nesse caso por imersão da cauda em água quente) foi capaz de revelar efeitos antinociceptivos em ratos submetidos à microinjeção intra-SCPd de capsaicina, um agonista vaniloide (McGaraughty et al., 2003), apontando, assim, um papel importante do teste, como sensível também a outras drogas não opióides, na compreensão da neurobiologia da dor.

1.5. NEUROQUÍMICA DAS REAÇÕES DE DEFESA E OS RECEPTORES

VANILOIDES

Dentre os mediadores centrais amplamente estudados que participam da neurobiologia das reações de defesa, destacam-se a serotonina (Deakin; Graeff, 1991; Nogueira; Graeff, 1995; Moraes; Bertoglio; Carobrez, 2008; Graeff, 2012), aminoácidos excitatórios (por ex., Bandler; Depaulis; Vergnes, 1985; Bandler; Carrive 1988; Moraes; Bertoglio; Carobrez, 2008), o óxido nítrico (Volke; Wegener; Vasar, 2003; Guimarães et al., 2005), o CRF – *Corticotropin releasing factor* (Millan et al., 2001; Takahashi et al., 2001) e a participação do sistema Gaba/benzodiazepínico (por ex., Brandão; de Aguiar; Graeff, 1982; Jacobson et al., 2007; Albrechet-Souza, 2009). O envolvimento de tais sistemas na neurobiologia das reações de defesa tem sido também explorado em pesquisas realizadas em nosso laboratório (por ex., Mendes-Gomes; Nunes-de-Souza, 2005; Miguel; Nunes-de-Souza, 2006; 2008; 2011; Carvalho-Neto et al., 2009; Gomes; Nunes-de-Souza, 2009; Nunes-de-Souza et al., 2010; Miguel, Gomes, Nunes-de-Souza, 2012; Campos et al., 2013). No entanto, a descoberta de novas substâncias e receptores vem ganhando destaque nos últimos anos e tem sido alvo de esforços para a compreensão de seus papéis em processos neurobiológicos do medo/ansiedade e nocicepção. Nesse sentido, vale destacar os endocanabinoides e mais recentemente os vaniloides, que se mostraram intimamente relacionados na modulação do processamento da dor.

Os receptores vaniloides TRPV1 (do inglês: *transient receptors potential vanilloid type 1*) pertencem a uma grande família de canais de cátions não seletivos (Caterina et al., 1997). Eles podem ser ativados pela elevação da temperatura, diminuição do pH, ou por ligantes exógenos como a capsaicina, o ingrediente que confere à pimenta vermelha o sabor picante (Szallasi; Blumberg, 1999; Van der Stelt; Di Marzo, 2004). Esses receptores têm sido relacionados à transmissão da dor e da resposta inflamatória

nas regiões periféricas do sistema nervoso (Gewehr et al., 2011; Akopian et al., 2009). Embora vários estudos tenham sido realizados mostrando o papel desempenhado por esses compostos vaniloides em neurônios sensoriais, há evidências crescentes apontando sua relevância no SNC e, mais recentemente, em emoções como o medo e a ansiedade (Van der Stelt; Di Marzo 2004; Terzian et al., 2009; Moreira et al., 2009).

Os receptores TRPV1 são expressos em várias regiões encefálicas relacionadas à ansiedade e à dor, incluindo a SCP (Mezey et al., 2000; McGaraughty et al., 2003), aonde podem modular a liberação de glutamato (Palazzo et al., 2002; Xing; Li, 2007). Há também evidências mostrando o papel desses receptores na regulação de respostas inflamatórias e de hiperalgesia, no corno dorsal da medula espinal (Talbot et al., 2012; Patwardhan et al., 2009). A função do receptor TRPV1 na dor tem sido objeto de vários estudos detalhados (para revisão ver Maione et al., 2006), e seu papel fundamental na nociceção e hiperalgesia foi confirmado em camundongos nocaute para receptores TRPV1 (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000), nos quais animais mostraram hipersensibilidade térmica diminuída num contexto de inflamação. A expressão de TRPV1 em estruturas supraespinais dos circuitos modulatórios da dor, como a SCP, bulbo ventromedial rostral (RVM), locus coeruleus (LC) e tálamo (Mezey; Tóth et al., 2000; Cristino et al., 2006; Maione et al., 2006), sugere a sua participação nas vias descendentes e ascendentes no processamento da dor. Com efeito, os estudos iniciais realizados por Palazzo et al. (2002), sobre o papel putativo de receptores TRPV1 localizados no circuito descendente nociceptivo na SCP-RVM, mostraram que microinjeções de capsaicina na porção dorsal da SCP (SCPd) aumentam a latência das respostas nociceptivas térmica em ratos, um efeito bloqueado por antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e metabotrópicos (mGlu) (Palazzo et al., 2002). Curiosamente, ambos antagonistas dos receptores mGlu(1) e mGlu(5) bloquearam o efeito do capsaicina. Da mesma forma, o

pré-tratamento com um antagonista de bloqueador de canal de sódio voltagem dependente, o qual inibe a liberação de glutamato, também antagonizou completamente o efeito da capsaicina (Palazzo et al., 2002). Dados discrepantes foram relatados em um estudo posterior, realizado por McGaraughty et al. (2003), em que a capsaicina, injetada na SCPdl, provocou diminuição da latência de retirada de cauda (teste de imersão da cauda em água quente) em animais acordados e estimulou atividade de células ON pró-nociceptivas no RVM de ratos anestesiados. Neste caso, um efeito analgésico tardio da capsaicina foi observado apenas após o efeito inicial pró-nociceptivo em ratos que foi atribuído a uma dessensibilização de receptores vaniloides.

1.6. VANILOIDES/CANABINOIDES NA MODULAÇÃO DA DOR

Um fato interessante relacionado aos canabinoides é que, tanto a anandamida (AEA) como o canabidiol (CBD), respectivamente, endocanabinoide e fitocanabinoide, se ligam aos receptores TRPV1 (Moreira et al., 2009; van der Stelt; Di Marzo, 2004; Marinelli et al., 2007). Essa propriedade ajuda a explicar as curvas dose resposta em forma de sino, geralmente encontradas com esses compostos quando empregados em modelos animais de medo/ansiedade. Sucintamente, enquanto a administração intra-SCPd de baixas doses de AEA estimula preferencialmente os receptores canabinoides CB1 (receptores metabotrópicos inibitórios), em altas doses, este endocanabinoide ativa receptores vaniloides TRPV1 (receptores ionotrópicos excitatórios) (Moreira; Aguiar; Guimarães, 2007). Assim, CB1 e TRPV1 parecem ter funções opostas na modulação de estados aversivos nessa região mesencefálica.

Contudo, num contexto de nocicepção, ambos os substratos canabinoide/vaniloide parecem exercer um papel ainda mais complexo. Por exemplo, a estimulação do receptor canabinoide tipo 1 (CB1), expresso em neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos na

SCP, leva a inibição ou excitação, respectivamente, do circuito de modulação da dor localizado no RVM (Vaughan et al., 2000; Maione et al., 2006; Palazzo et al., 2008). Portanto, a nocicepção mediada por CB1 está sob uma modulação complexa e efeitos paradoxais foram relatados (Meng et al., 1998; Meng e Johansen, 2004; Maione et al., 2006). Além disso, a estimulação de TRPV1 expressos em neurônios glutamatérgicos provoca a liberação de glutamato no RVM, que, por sua vez, ativa o sistema inibitório descendente, levando a antinocicepção (Palazzo et al., 2002; Starowicz et al., 2007; Mascarenhas et al., 2015). No entanto, os efeitos contrastantes, isto é, a hipernocicepção, também foram relatados após a estimulação de TRPV1, uma ação atribuída à capacidade de dessensibilização de TRPV1 (McGaraughty et al., 2003). Além disso, Maione e colaboradores (2006) mostraram que a inibição na SCPv1 da enzima FAAH (do inglês: *Fatty Acid Amide Hydrolase*), que degrada a AEA, provocou tanto anti quanto hipernocicepção via TRPV1 ou CB1, respectivamente, em ratos submetidos ao teste plantar de dor. No entanto, resta determinar se a AEA exógena injetada na SCP desempenha um papel na modulação da dor aguda.

1.7. SENSIBILIDADE DOS TRPV1 À ANANDAMIDA

Foi um grande avanço para a compreensão da neurotransmissão vaniloide quando a anandamida se mostrou como um composto endógeno capaz de ativar TRPV1 *in vitro*, além de provocar efeitos vasculares mediados pelo canal TRPV1 *in vivo* (Zygmunt et al., 1999). Em geral, a atividade *in vivo* dos TRPV1 parece ser dependente do seu estado de sensibilização. Há vários mecanismos identificados que regulam a atividade TRPV1. Uma das vias mais estudadas é a fosforilação do TRPV1, que afeta a sua sensibilidade a vaniloides e, por consequência, à AEA (Figura 1). TRPV1 é fosforilado em resíduos de serina e treonina por proteína-quinase C (PKC) (Bhave et al, 2003; Premkumar; Ahern,

2000), proteína-quinase A (PKA) (Bhave et al, 2002), proteína-quinase D (PKD) (Wang et al, 2004) e cálcio calmodulina dependente da proteína-quinase II (CaMKII) (Jung et al., 2004). A proteína fosfatase 2B (calcineurina) foi descrita como uma importante enzima para a desfosforilação do canal, levando a dessensibilização do receptor (Cortright; Szallasi, 2004; Docherty et al., 1996; Lizanecz et al., 2006; Mohapatra; Nau, 2005). Além disso, a fosforilação em resíduos de tirosina em TRPV1 também foi relatada (Jin et al., 2004).

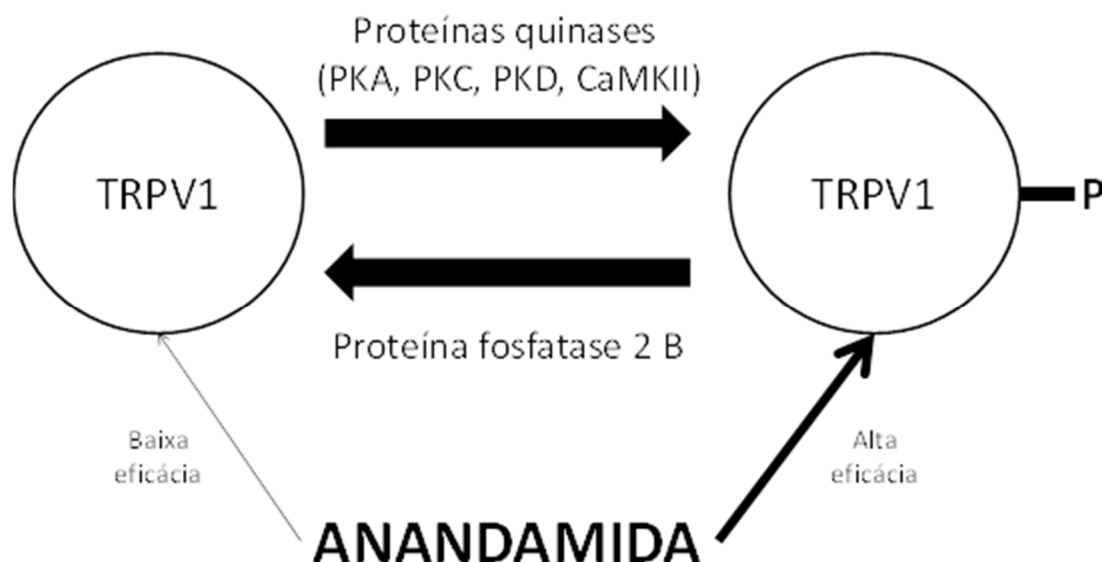


Figura 1: Sensibilização do canal TRPV1 pela anandamida (AEA) e as várias proteínas quinases envolvidas no processo de fosforilação. Adaptado de Tóth et al. (2009).

Um papel decisivo da PKC e da proteína fosfatase 2B (calcineurina) foi descrito na regulação da responsividade da anandamida ao canal TRPV1 (Lizanecz et al., 2006). Esses achados sugerem o seguinte modelo: TRPV1 é fosforilado sob condições de repouso. Após a ativação por anandamida, íons Ca^{2+} fluem através do canal e ativam a proteína fosfatase 2B dependente de Ca^{2+} . A fosfatase ativada desfosforila o canal TRPV1, tornando-o insensível a anandamida e outros vaniloides (dessensibilização

aguda) (Lizanecz et al., 2006). O fechamento do canal pode resultar na restauração das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , inativação da proteína fosfatase 2B, e subsequente fosforilação de TRPV1.

Uma vez que os substratos canabinoides e vaniloides levam a efeitos paradoxais na nocicepção devido às propriedades fisiológicas (diferentes neurônios que expressam os receptores CB1) e farmacológicas (fenômeno de dessensibilização) de cada sistema, respectivamente, levantamos a hipótese de que a AEA exógena levaria a um efeito antinociceptivo mais claro e reprodutível via estimulação dos TRPV1 que são expressos somente em neurônios glutamatérgicos da circuitaria SCP-RVM. Ainda, não existem estudos explorando o papel dos receptores TRPV1/CB1 na AIE de derrota social. Portanto, nossa segunda hipótese principal é de que o estresse de derrota social provoca antinocicepção via ativação de TRPV1 e CB1 e que a fosforilação dos TRPV1 aumenta a responsividade desse receptor à AEA liberada pelo estresse de derrota social.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O presente estudo teve o objetivo de investigar: (i) o papel da Anandamida exógena na dor aguda especificamente via estimulação dos TRPV1 ou CB1 intra-SCPd de camundongos; (ii) a participação dos TRPV1/CB1 intra-SCPd na antinocicepção induzida pelo estresse de derrota social em camundongos; e (iii) a responsividade dos TRPV1 intra-SCPd fosforilados à anandamida endógena liberada pelo estresse de derrota social.

2.2. Específicos

- Investigar o efeito da microinjeção intra-SCPd de anandamida (agonista TRPV1 endógeno), capsaicina (agonista TRPV1), WIN (agonista CB1), AM251 (antagonista CB1), 6-iodonordihidrocapsaicina (6-IODO; antagonista seletivo TRPV1), capsazepina (antagonista TRPV1) e ciclosporina A (inibidor da calcineurina) na nocicepção em camundongos submetidos ao teste de *tail-flick*;
- Investigar o efeito sobre a nocicepção do pré-tratamento intra-SCPd de AM251 ou 6-IODO seguido pela tratamento local com AEA em camundongos submetidos ao teste de *tail-flick*;
- Investigar o efeito da microinjeção intra-SCPd de AM251 e capsazepina na antinocicepção induzida pelo estresse de derrota social, através do teste de *tail-flick*;
- Investigar o efeito da microinjeção intra-SCPd de ciclosporina A na antinocicepção induzida pelo estresse de derrota social, através do teste de *tail-flick*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos

Camundongos Suíços albinos machos (250 no total), pesando entre 25-35g, foram mantidos em condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07h00min), com livre acesso ao alimento e a água, exceto durante os períodos de experimento. Os experimentos foram iniciados após aprovação do protocolo experimental pelo comitê de ética local (CEUA/FCF/Ar nº 16/2013). Todo esforço foi feito a fim de minimizar o sofrimento dos animais.

3.2. Fármacos

Foram utilizados o antagonista de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1), AM251 (Sigma-Aldrich; nas doses de 1 ou 10 pmol solubilizado em DMSO 20% em salina); o agonista CB1/TRPV1 anandamida em Tocrisolve™¹ (Tocris Bioscience; nas doses de 0,5, 5 ou 50 pmol solubilizado em salina); os antagonistas de receptores TRPV1 capsazepina (Tocris Bioscience; nas doses de 10 ou 30 nmol solubilizado em DMSO 100%) e 6-Iodonordihidrocapsaicina (6-IODO; Tocris Bioscience; nas doses de 1,0 e 3,0 nmol solubilizado em DMSO 100%); o agonista TRPV1 capsaicina (Tocris Bioscience, nas doses de 0,01, 0,1 ou 1 nmol solubilizado em DMSO 100%); o agonista de receptores CB1 WIN 55,212-2 (Tocris Bioscience, nas doses de 1, 10 e 50 nmol solubilizado em DMSO 100%) e o inibidor da fosfatase 2B, ciclosporina A (Tocris Bioscience, nas doses de 0,01, 0,1 ou 1 μmol solubilizado em DMSO 100%). Os grupos veículos foram DMSO 100%, DMSO 20% em salina, salina e Tocrisolve™ de acordo com cada droga utilizada. As doses escolhidas foram baseadas em estudos prévios (Terzian et al., 2009; Pearce et al., 2008; Fogaça et al., 2012; Mascarenhas et al., 2013, 2015).

1- Tocrisolve™: Emulsão solúvel em água composta por uma proporção 1: 4 de óleo de soja / água que é emulsionada com o copolímero em bloco Pluronic F68. Pode ser diluído com qualquer meio aquoso.

3.3. Cirurgia e administração intra-SCPd de fármacos

Os animais receberam implantação unilateral cânulas-guia (26-gauge) de 7 mm de comprimento, após anestesia com cetamina + xilazina (100 mg/Kg + 10 mg/Kg). As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico, através das coordenadas estereotáxicas definidas pelo atlas de Franklin & Paxinos (2001). A implantação das cânulas-guia na SCPd foi baseada nas seguintes coordenadas estereotáxicas: 4,1 mm posterior ao bregma, 1,4 mm lateral à linha média, 2,3 mm ventral a superfície craniana, num ângulo de 26°. A ponta da cânula-guia foi posicionada 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. Para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação, foi inserido um estilete (mandril) nas cânulas-guia. Ao final da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de penicilina benzatina (Pentabiótico, 56,7 mg/kg em um volume de 0,1 mL; Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e uma injeção subcutânea do analgésico anti-inflamatório Banamine (3,5 mg/kg de megluminato de flunixinina, Intervet Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, em um volume de 0,3 mL).

A injeção intra-SCPd das soluções foi realizada pela introdução de uma agulha de injeção (33-gauge) de 8 mm de comprimento dentro de cada cânula-guia. Cada agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10) a microsseringas Hamilton. O volume máximo de cada microinjeção foi de 0,2 µL (SCPd) num intervalo de tempo de aproximadamente 30 segundos. O procedimento de microinjeção consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, infusão da solução, permanência da agulha de injeção por 60 segundos após o término da injeção e inserção do mandril, enquanto o animal foi contido manualmente pelo experimentador com o uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmou o fluxo da solução.

3.4. Teste da retirada da cauda (*tail-flick*)

Os animais foram colocados na superfície do aparato para medir a latência de retirada da cauda (LRC) basal; cada camundongo foi gentilmente contido e submetido a uma fonte de luz direcionada ao terço medial da cauda. O acionamento do aparato (emissão de luz; estímulo nociceptivo térmico) ativa simultaneamente um cronômetro, que registra o tempo, em segundos, do teste. O deslocamento (flexão) da cauda permite que o raio de luz ative uma célula fotoelétrica montada em cima do aparato, levando à interrupção automática da emissão do estímulo térmico e à parada do cronômetro, o que compreende o término do teste. A intensidade da luz (35 mA) foi ajustada a fim de obtermos linhas de base de retirada da cauda entre 2,0-3,0 segundos, assim poderíamos detectar eventuais efeitos analgésico e hiperalgésico dos fármacos utilizados. No Experimento 4, em que era esperada uma potencialização da analgesia induzida pela derrota social, aumentamos a intensidade da luz para 45 mA a fim de obtermos linhas de base mais baixas (entre 1,0-2,0 s), assim podendo detectar o referido efeito. Um tempo de corte de 6 s foi utilizado em animais não reativos ou que apresentaram analgesia teto a fim de minimizar lesões teciduais. Um estudo piloto foi conduzido no intuito de revelar se 7 (ou 8 no caso dos Exp.1C e 4) medidas de LRC eram capazes de provocar lesão tecidual na cauda dos camundongos e nenhum efeito aparente foi detectado até 24h após a última medida. Cada LRC foi normalizada pelo cálculo de um índice de analgesia (IA):

$$IA = \frac{(LRC_{teste}) - (m\u00e9dia LRC_{basal})}{6 - (m\u00e9dia LRC_{basal})}$$

Onde:

IA: índice de analgesia.

LRCteste: latência de retirada da cauda a cada intervalo de tempo registrada após o tratamento farmacológico.

Média LRCbasal: média das latências de retirada da cauda basais registradas 10 minutos e imediatamente antes do tratamento farmacológico.

6: tempo de corte em segundos.

3.5. Estresse de derrota social

Camundongos intrusos (sujeitos experimentais) foram individualmente expostos na gaiola moradia de um camundongo residente agressor – sujeito que exhibe comportamentos espontâneos de agressão (através de mordidas) aos demais da gaiola e que estão alocados num armário de ventilação controlada (a fim de minimizar que o seu odor se dissipe) no nosso biotério local. A interação agressiva ocorreu até o animal intruso exibir a postura de submissão – denominada levantar defensivo (elevação do corpo sobre as patas traseiras, patas dianteiras estendidas em direção ao agressor, cabeça retraída e orelhas arqueadas; Miczek et al., 1982). Em seguida, o animal intruso permaneceu por 5 minutos dentro da gaiola do animal residente, porém sem contato físico, isolado por um recipiente de acrílico perfurado ($6 \times 6 \times 12$ cm), que o permitiu o contato olfatório, auditivo e visual com o agressor (estresse psicológico). Após esse período, o camundongo intruso foi retirado da gaiola do residente, colocado individualmente em uma gaiola moradia, onde permaneceu por 5 minutos, para em seguida ser submetido ao teste de *tail-flick*.

Em relação aos agressores (residentes), assim que todos os camundongos chegam ao biotério, eles são isolados de qualquer gaiola. Neste sentido, eles devem necessariamente contemplar os critérios de apresentar mordidas espontâneas nos outros animais além de serem naïve. Eles são isolados individualmente por no mínimo 4

semanas, a fim de intensificar o comportamento agressivo (Valzelli, 1981), antes de serem usados para as sessões de derrota social. Após este período de 1 mês, os agressores são utilizados em diversos protocolos de derrota social obedecendo alguns critérios éticos, como por exemplo: participam de, no máximo, 4 encontros agressivos por dia, durante 3 dias por semana; têm sua gaiola moradia limpa semanalmente e são permanentemente avaliados em relação à sua saúde aparente (peso, consumo de água e comida, integridade do pelo e exibição de comportamentos que refletem algum tipo de sofrimento). Eles permanecem em uso por 1 ano em média, até apresentarem alguma debilidade (machucado, perda de peso, etc) decorrente da interação com os intrusos ou quando deixaram de agredir o intruso em três sessões consecutivas de derrota social, quando então são sacrificados por aprofundamento anestésico seguido de deslocamento cervical.

3.6. Procedimentos

Os Experimentos foram realizados de 5 a 7 dias após a cirurgia estereotáxica e todos os animais foram levados à sala experimental 1 hora antes do início do teste, para habituação.

Experimentos 1A-G: Avaliação dos efeitos da microinjeção intra-SCPd de AEA (agonista TRPV1/CB1), capsaicina (agonista TRPV1), WIN (agonista CB1), AM251 (antagonista CB1), 6-iodo (antagonista seletivo TRPV1), capsazepina (antagonista TRPV1) e ciclosporina A (CsA – inibidor da fosfatase 2B) na nocicepção.

O Experimento 1 consistiu na obtenção da curva dose resposta dos compostos acima mencionados sobre suas participações na nocicepção. Os camundongos tiveram duas medidas basais de LRC no *tail-flick*, com um intervalo de 10 minutos entre cada medição, e, posteriormente, foram submetidos à microinjeção intra-SCPd de anandamida (veículo, 0,5, 5 ou 50 pmol – Exp.1A), capsaicina (veículo, 0,01, 0,1 ou 1 nmol – Exp.1B), WIN (veículo, 1, 10 ou 50 nmol – Exp.1C), AM251 (veículo, 1 ou 10 pmol – Exp.1D),

6-IODO (veículo, 1 ou 3 nmol – Exp.1E), capsazepina (veículo, 10 ou 30 nmol – Exp.1F) ou CsA (veículo, 0,01, 0,1 ou 1,0 μ mol – Exp.1G). Em seguida, os animais foram submetidos ao teste do *tail-flick* nos tempos 10, 15, 20, 30 e 40 min pós-microinjeção (Figura 2).

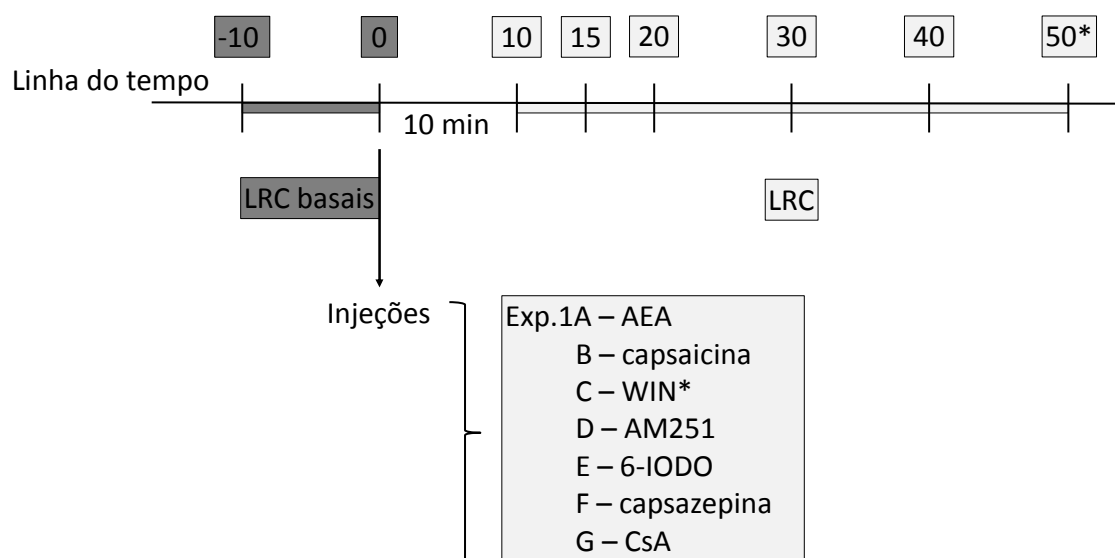


Figura 2: linha do tempo do Experimento 1.

Experimento 2A-B: Avaliação dos efeitos da AEA intra-SCPd na nocicepção sob bloqueio local de CB1 ou TRPV1.

Além dessas curvas dose respostas, dois grupos de animais foram submetidos às medidas basais da LRC, seguidos pelo pré-tratamento de AM251 (veículo, 10 pmol – Exp.2A) ou 6-IODO (veículo, 1,0 nmol – Exp.2B) e, 10 minutos após, pelo tratamento com anandamida (veículo, 0,5, 5 ou 50 pmol), a fim de revelar os efeitos desse agonista endógeno ligado preferencialmente em receptores TRPV1 ou CB1, respectivamente. Em seguida, os animais foram submetidos ao teste de *tail-flick* nos tempos 10, 15, 20, 30 e 40 min pós-tratamento (Figura 3).

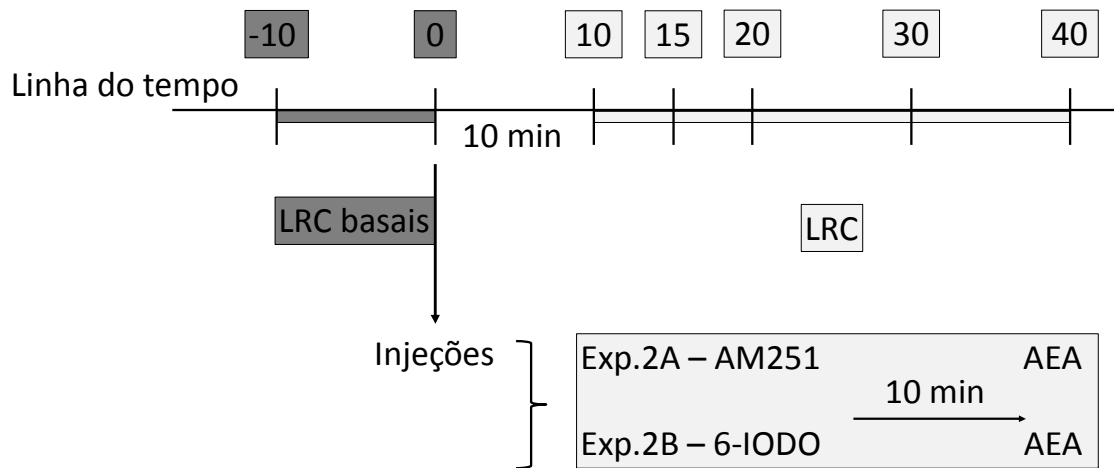


Figura 3: linha do tempo do Experimento 2.

Experimento 3: Avaliação dos efeitos da microinjeção de AM251 ou capsazepina na modulação da antinociceção induzida pelo estresse de derrota social.

O Experimento 3 foi delineado na intenção de contribuir com o papel dos receptores TRPV1 e CB1 intra-SCPd na modulação da antinociceção induzida pelo estresse de derrota social em camundongos. Desta maneira, após o registro das LRC basais os animais foram tratados intra-SCPd com o antagonista vaniloide capsazepina (veículo, 10 nmol) ou com o antagonista canabinoide AM251 (veículo, 10 pmol), ambos desprovidos de efeitos intrínsecos na nociceção. Cinco minutos após o tratamento, os animais foram expostos ao estresse de derrota social e imediatamente após o estresse foram registradas as LRC nos tempo 0, 5, 10, 20 e 30 min pós-estresse (Figura 4).

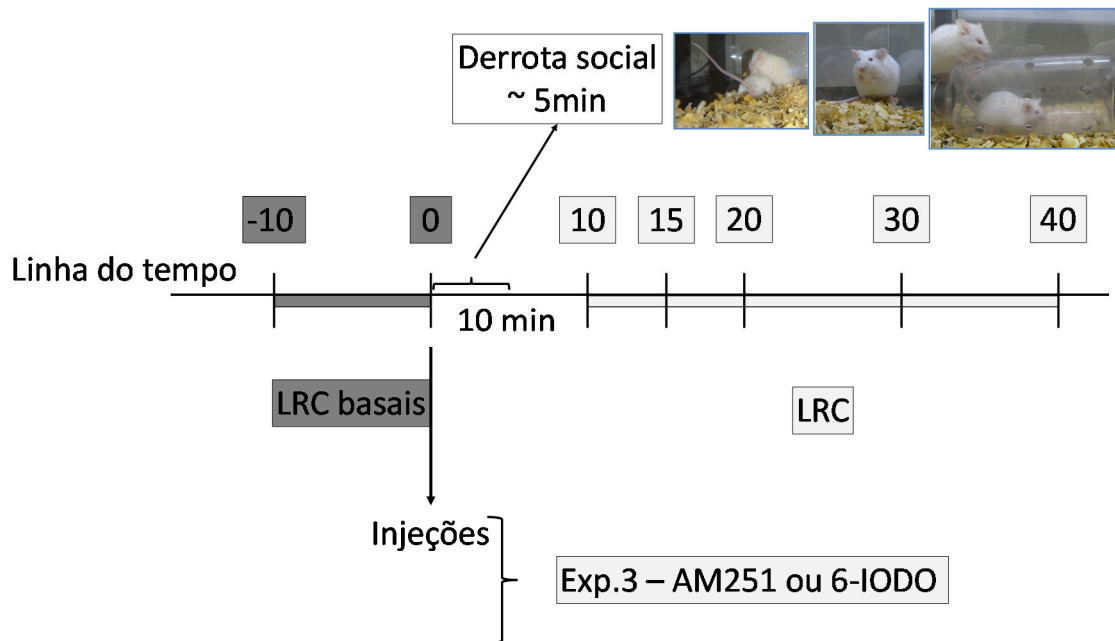


Figura 4: linha do tempo do Experimento 3.

Experimento 4A-B: Avaliação dos efeitos da microinjeção de ciclosporina A na modulação da antinocicepção induzida pelo estresse de derrota social.

Nesta etapa, a fim de revelarmos o papel dos TRPV1 fosforilados sobre sua participação na AIE de derrota social, os animais foram expostos ao *tail-flick* para registro das LRC basais e em seguida foram tratados previamente com AM251 (10 pmol ou veículo) seguido 10 minutos após pelo tratamento com CsA (0,1 μmol – dose sem efeito intrínseco na nocicepção segundo curva dose efeito reportada no Exp.1G) intra-SCPd (Exp.4A). Cinco minutos após o tratamento de CsA, os animais foram expostos ao estresse de derrota social e imediatamente após o estresse foram registradas as LRC nos tempo 0, 5, 10, 20, 30 e 40 min pós-estresse (Figura 5).

Além disso, o Experimento 4B consistiu em revelar se o potencial efeito da CsA era devido a fosforilação dos TRPV1 e não a inibição da calcineurina. Para tanto, camundongos foram submetidos a duas medidas basais de LRC e em seguida foram pré-tratados intra-SCPd com AM251 (veículo; 10 pmol) ou com uma combinação de AM251/6-IODO (10 pmol/1,0 nmol) seguido por CsA (0,1 μmol) dez minutos depois.

Cinco minutos após o tratamento com CsA os animais passaram pelo protocolo de derrota social e tiveram a LRC registrada nos tempo 0, 5, 10, 20, 30 e 40 min pós estresse (Figura 5).

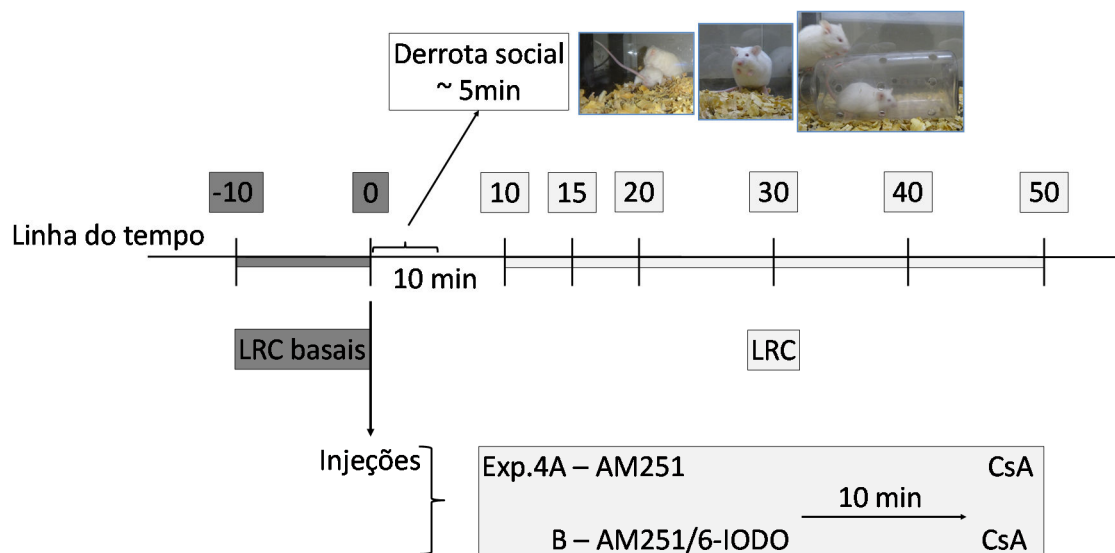


Figura 5: linha do tempo do Experimento 4.

3.7. Histologia

Após o término dos experimentos, todos os animais receberam injeção de uma solução de 1% de azul de Evans na SCPd, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de Fármacos. Em seguida, os animais foram decapitados, seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) e, posteriormente, sofreram secções coronais ao longo do trajeto da cânula com o uso de um criostato (Leica CM 1850). As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DMLB) e a visualização da dispersão do azul de Evans foi considerada indicativa do local da injeção.

3.8. Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de Levene. Posteriormente, os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA

bifatorial (fator tratamento e fator tempo – medidas repetidas), exceto o Exp. 4A, em que a ANOVA de três fatores foi utilizada (fator pré-tratamento; fator tratamento e fator tempo – medidas repetidas), seguida de comparações múltiplas de Duncan e comparações planejadas. Valores de P iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

Primeiramente, devido aos diferentes grupos veículos usados para dissolver os fármacos testados ao longo do estudo, uma comparação da LRC de camundongos tratados com veículo foi realizada para excluir/detectar quaisquer efeitos mediados por veículo na nocicepção. O procedimento foi semelhante ao realizado no Exp.1A-G. Os grupos veículos foram salina (Exp. 1A), DMSO não diluído (Ex. 1B, 1C, 1E, 1F, 1G) e DMSO 20% em solução salina (Exp. 1D). Além disso, um grupo de animais tratado com Tocrisolve™ (n = 7) intra-SCPd também foi incluído nesta análise, uma vez que AEA, um composto lipídico, deve ser dissolvida nesta formulação, o que permite uma diluição conveniente em qualquer meio aquoso. Importante, a ANOVA bifatorial não revelou significância para nenhum fator (todos os valores de $F \leq 0,82$; $p > 0,05$) (dados não mostrados).

4.1. Histologia

A histologia confirmou que 181 camundongos tiveram a cânula posicionada na porção dorsal da SCP.

Sessenta animais foram usados no Experimento 1 que consistiu na construção das curvas dose efeito [Exp.1A: veículo (n = 5); AEA 0,5 pmol (n = 4); AEA 5,0 pmol (n = 4); AEA 50,0 pmol (n = 5)]; [Exp.1B: veículo (n = 6); cpsa 0,01 nmol (n = 5); cpsa 0,1 nmol (n = 6); cpsa 1 nmol (n = 5)]; [Exp.1C: veículo (n = 7); WIN 1 nmol (n = 5); WIN 10 nmol (n = 6); WIN 50 nmol (n = 6)]; [Exp.1D: veículo (n = 5); AM251 1 pmol (n = 4); AM251 10 pmol (n = 4)]; [Exp.1E: veículo (n = 4); 6-IODO 1 nmol (n = 6); 6-IODO 3 nmol (n = 5)]; [Exp.1F: veículo (n = 8); cpz 10 nmol (n = 4); cpz 30 nmol (n = 7)]; [Exp.1G: veículo (n = 4); CsA 0,01 μ mol (n = 5); CsA 0,1 μ mol (n = 4); CsA 1 μ mol (n = 6)].

Quarenta e nove animais foram usados no Experimento 2 no intuito de revelar o papel da AEA nos diferentes substratos modulando a dor aguda [Exp.2A:

AM251+veículo (n = 4); AM251+AEA 0,5 pmol (n = 6); AM251+AEA 5 pmol (n = 5); AM251+AEA 50 pmol (n = 7)]; [Exp.2B: 6-IODO+veículo (n = 5); 6-IODO+AEA 0,5 pmol (n = 4); 6-IODO+AEA 5 pmol (n = 5); 6-IODO+AEA 50 pmol (n = 6)]. Além disso, 7 camundongos receberam uma injeção de Trocisolve™ na SCPd e foram incluídos em um grupo separado para serem comparados aos outros camundongos tratados com veículo (ver grupos de veículos acima).

Trinta e dois animais foram usados no Experimento 3 para revelar o papel dos substratos vaniloides/canabinoides na modulação da antinocicepção induzida pela derrota social [Exp.3: DMSO100% (n = 8); salina em DMSO20% (n = 7); cpz 10 nmol (n = 8); AM251 10 pmol (n = 9)].

Quarenta animais foram usados no Experimento 4 para revelar os efeitos da CsA na AIE de derrota social [Exp.4A: veículo+veículo (n = 6); veículo+CsA 0,1 μmol (n = 7); AM251 10 pmol+veículo (n = 6); AM251 10 pmol+CsA 0,1 μmol (n = 7)]; [Exp.4B: veículo+CsA (n = 4); AM251 10 pmol+CsA (n = 5); AM251/6-IODO+CsA (n = 5)].

Sessenta e nove animais foram excluídos do estudo. Oito deles alcançaram o tempo de corte na medida de LRC basal (animais insensíveis ao teste), cinquenta e oito tiveram a cânula posicionada fora da estrutura alvo (i.e., SCPd) e três não tiveram uma distribuição normal da LRC e, de acordo com o teste de Grubb, foram retirados do estudo.

A Figura 6 mostra: (A) no lado esquerdo uma representação esquemática de um encéfalo de camundongo baseado no atlas de Franklin e Paxinos (2001), indicando a SCPd (área cinza), e no lado direito uma secção coronal da região mesencefálica de um sujeito representativo, mostrando um sítio de injeção na SCPd; (B) a dispersão dos sítios de injeção na SCPd dos animais.

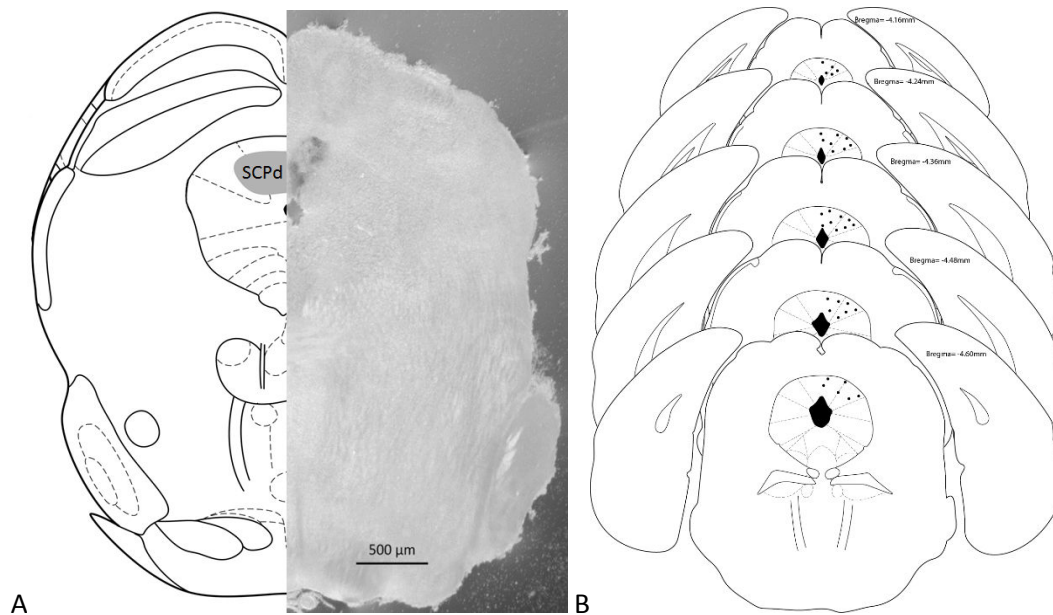


Figura 6: (A) Representação esquemática (esquerda) e fotomicrografia (direita) do cérebro de camundongos. Ambos os quadros (esquerda e direita) correspondem a -4,16 mm de bregma. (B) Representação esquemática dos sítios de microinjeção no SCPd. O número de pontos é representativo e menor que o número real de animais devido a sobreposição. A histologia revelou que todos os locais de injeção positiva estavam entre -4,16 e -4,60 mm de bregma (com base em Paxinos e Franklin, 2001).

4.2. Experimento 1A: ausência de efeito da anandamida em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 7 mostra os efeitos da microinjeção intra-SCPd de anandamida (veículo, 0,5, 5 ou 50 pmol) na LRC de camundongos expostos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA bifatorial não revelou diferenças significativas em nenhum fator bem como na interação entre esses (todos os valores de $F_{3,14} \leq 0,46$; $p > 0,05$).

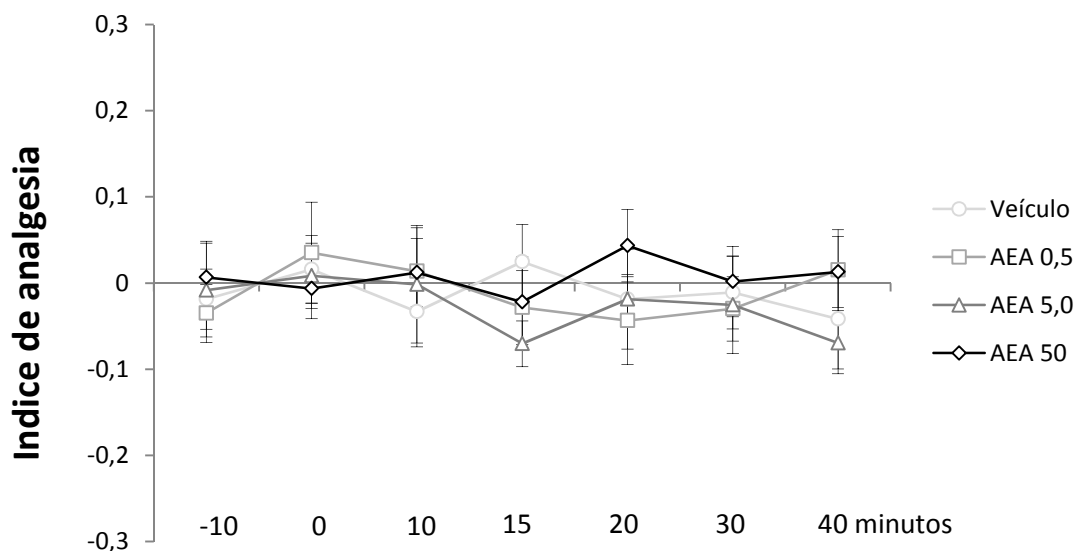


Figura 7: Efeito da microinjeção de anandamida na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. N=4-5/grupo. Os pontos no gráfico representam a média ± EPM. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.3. Experimento 1B: efeito antinociceptivo da capsaicina em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 8 mostra os efeitos da microinjeção intra-SCPd de capsaicina (veículo, 0,01, 0,1 ou 1 nmol) na LRC de camundongos expostos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA bifatorial revelou significância para o fator tratamento ($F_{3,18}=36,6$; $p<0,05$), fator tempo ($F_{6,108}=24,75$; $p<0,05$) e interação entre os fatores ($F_{18,108}=13,78$; $p<0,05$). O teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou um efeito antinociceptivo da capsaicina 1 nmol até 20 minutos pós tratamento. A dose intermediária (0,1 nmol) provocou uma diminuição na nocicepção em menor magnitude, contudo, com maior duração (30 minutos). Aos 40 minutos pós tratamento, não foi possível observar efeitos na nocicepção ($p>0,05$).

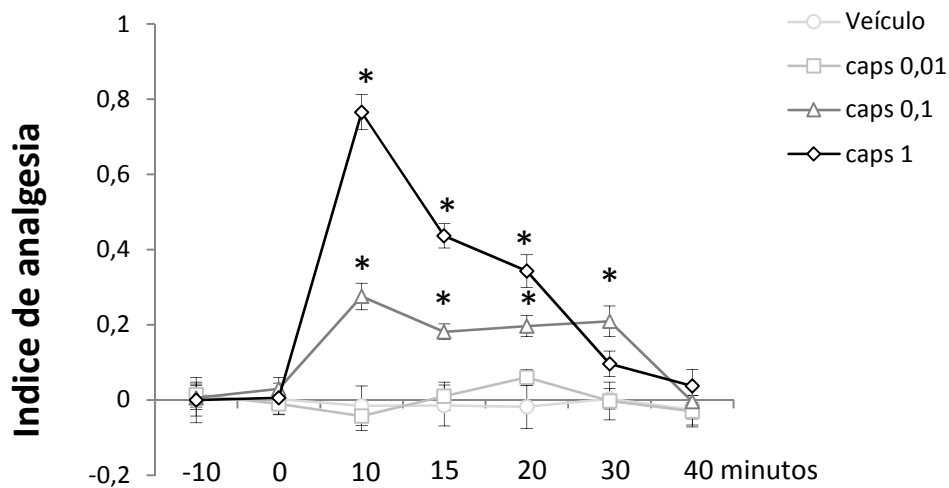


Figura 8: Efeito da microinjeção de capsaicina na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. N=5-6. Os pontos no gráfico representam a média representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ comparado com o grupo veículo. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.4. Experimento 1C: efeito antinociceptivo do WIN 55,212-2 em camundongos expostos ao *tail-flick*.

Analisando a Figura 9 é possível interpretar os efeitos do WIN intra-SCPd (veículo, 1, 10 ou 50 nmol) na LRC de camundongos. ANOVA bifatorial apontou significância no fator tratamento [$F(3,20)=12.62$; $p<0.05$], tempo [$F(7,140)=5.61$; $p<0.05$] bem como na interação tratamento x tempo [$F(21,140)=2.34$; $p<0.05$]. A análise post hoc confirmou um efeito do agonista CB1 comparado com o veículo, do tipo dose dependente (10 e 50 nmol) que durou 20 minutos ($p<0.05$). A dose mais baixa (1 nmol) causou um efeito antinociceptivo tardio 40 minutos após o tratamento. No minuto 50 não foi observado efeito algum na nocicepção ($p>0.05$).

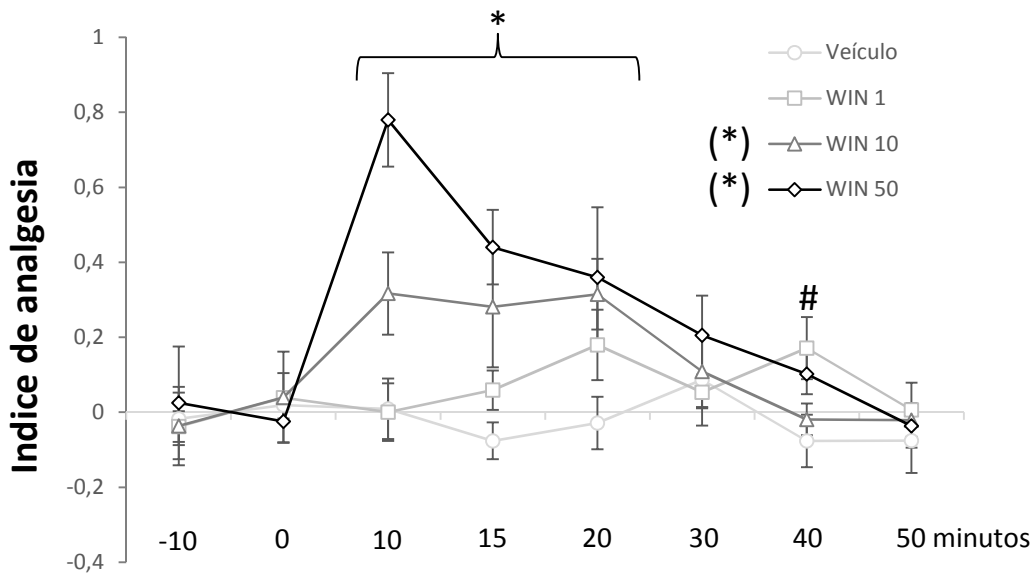


Figura 9: Efeito da microinjeção de WIN na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. N=5-7. Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ comparado com o grupo veículo até 20 minutos pós tratamento. # $P<0,05$ comparado com o grupo veículo. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.5. Experimento 1D: Ausência de efeitos do AM251 na nocicepção de camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 10 resume a ausência de efeitos intra-SCPd de AM251 (veículo, 1 ou 10 pmol) na LRC de camundongos. A ANOVA bifatorial não revelou quaisquer significância para os fatores (todos os valores de $F \leq 0.83$; $p > 0.05$).

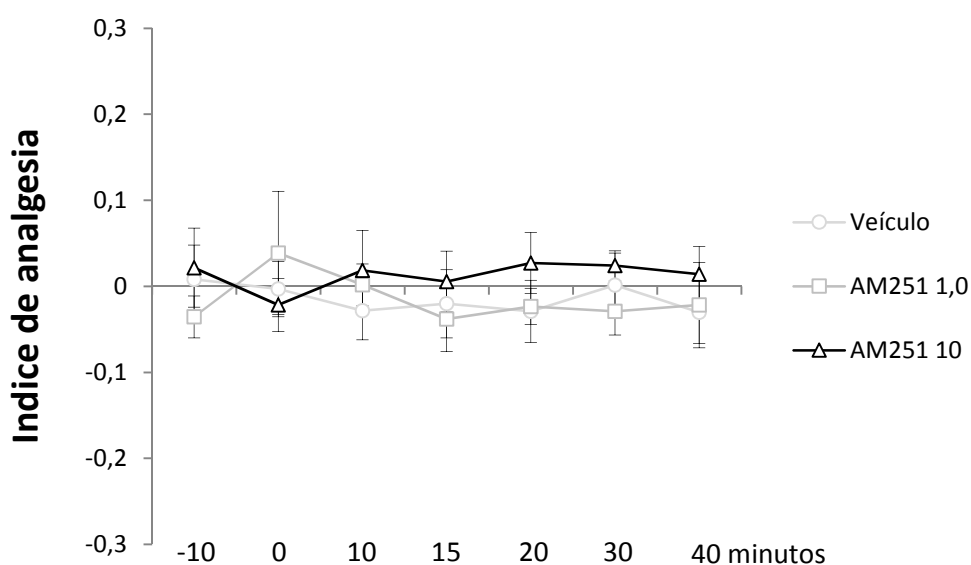


Figura 10: Efeito da microinjeção de AM251 na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. N=4-5. Os pontos no gráfico representam a média e os erros representam a média \pm EPM. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.6. Experimento 1E: efeito hipernociceptivo da 6-IODO em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 11 resume os efeitos da microinjeção intra-SCPd de 6-IODO (veículo, 1,0 ou 3,0 nmol) na LRC de camundongos expostos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA bifatorial revelou diferenças para o fator tratamento ($F_{2,12}=18,66$; $p<0,05$) e para a interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{12,72}=2,34$; $p<0,05$). O teste post hoc de Duncan confirmou que o grupo tratado com 6-IODO (3,0 nmol) teve uma diminuição do índice de analgesia, por 20 minutos, sugerindo um efeito pró-nociceptivo deste antagonista seletivo TRPV1 comparado com o grupo veículo ($p<0,05$). Depois de 40 minutos, nenhum tratamento modificou o LRC dos animais ($p>0,05$).

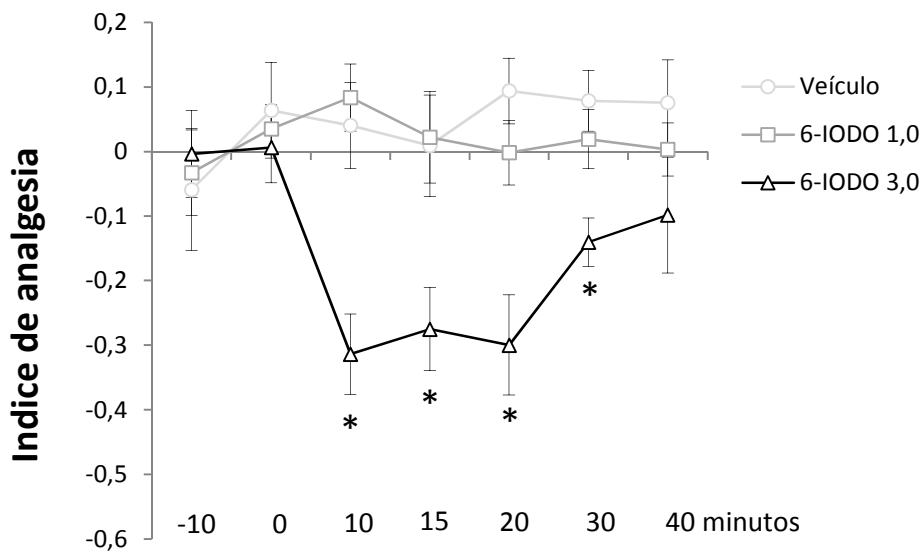


Figura 11: Efeito da microinjeção de 6-IODO na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. N=4-6/grupo. Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ comparado com o grupo veículo. O tempo 0 indica o momento da microinjeção

4.7. Experimento 1F: efeito hipernociceptivo da capsazepina em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 12 mostra os efeitos da microinjeção intra-SCPd de capsazepina (veículo, 10 ou 30 nmol) na LRC de camundongos expostos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA bifatorial mostrou significância no fator tratamento e interação entre tempo x tratamento [tratamento ($F_{2,16}=11,25$); interação ($F_{12,96}=2,37$); $p<0,05$]. O teste post hoc de Duncan revelou que o tratamento com capsazepina (30 nmol) sugere um perfil pró-nociceptivo quando comparado ao grupo veículo durante todo o teste ($p<0,05$).

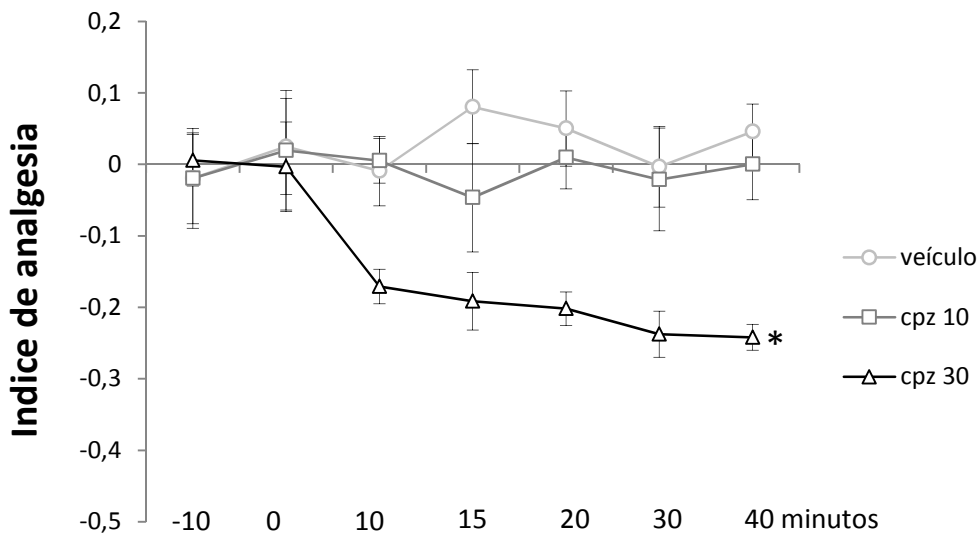


Figura 12: Efeito da microinjeção de capsazepina na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. N=4-8/grupo. Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ comparado com o grupo veículo durante todo o teste. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.8. Experimento 1G: efeito antinociceptivo da ciclosporina A em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 13 mostra os efeitos da injeção intra-SCPd de CsA (veículo, 0,01, 0,1 ou 1 μmol) na LRC de camundongos expostos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA bifatorial revelou significância para o fator tratamento ($F_{3,15}=28,39$; $p<0,05$) e para a interação entre os fatores ($F_{18,90}=3,23$; $p<0,05$). O teste post hoc de Duncan confirmou um efeito antinociceptivo da CsA na dose de 1 μmol durante todo o teste em relação ao veículo ($p<0,05$).

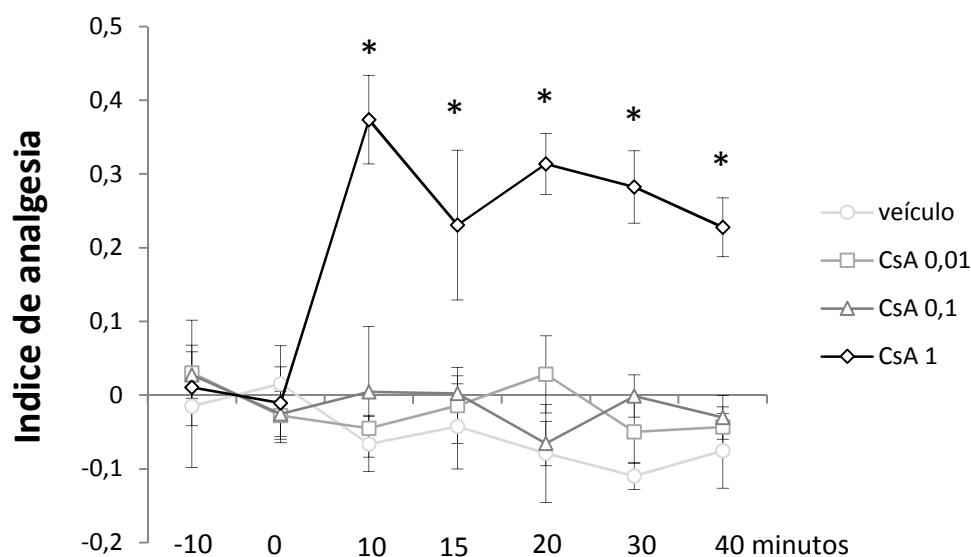


Figura 13: Efeito da microinjeção de CsA na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. $N=4-6$ /grupo. Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ comparado com o grupo veículo. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.9. Experimento 2A: efeito antinociceptivo da anandamida intra-SCPd sob bloqueio local dos receptores CB1 em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 14 mostra os efeitos da microinjeção intra-SCPd de AM251 (10 pmol – dose desprovida de efeito intrínseco na nocicepção) seguido de anandamida local (veículo, 0,5, 5 ou 50 pmol) na LRC de camundongos expostos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA bifatorial revelou significância para o fator tratamento ($F_{3,18}=77,91$; $p<0,05$), fator tempo ($F_{6,108}=20,06$; $p<0,05$) e interação entre os fatores ($F_{18,108}=13,8$; $p<0,05$). O teste post hoc de Duncan revelou um perfil antinociceptivo da AEA na maior dose (50 pmol) que durou por 20 minutos comparado com o veículo. A dose intermediária (5 pmol) provocou uma antinocicepção de menor magnitude nos 15 minutos pós tratamento comparado com veículo ($p<0,05$). Importante destacar que os efeitos observados foram na presença do antagonista de receptores CB1. Passados 40 minutos do teste, nenhum grupo apresentou efeitos na nocicepção ($p>0,05$).

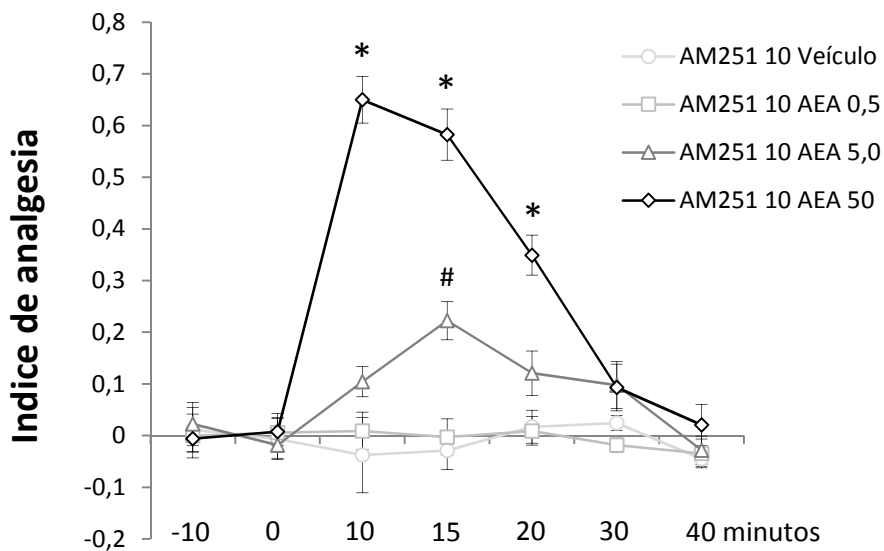


Figura 14: Efeito da microinjeção de AM251 seguido de anandamida na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. N=4-6/grupo. Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ comparado com o grupo veículo. # $P<0,05$ comparado com o grupo veículo e AEA 50. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.10. Experimento 2B: ausência de efeito da anandamida intra-SCPd sob bloqueio local dos receptores TRPV1 em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 15 representa a ausência de efeitos da AEA (veículo, 0,5, 5 ou 50 pmol) intra-SCPd sob bloqueio local dos receptores TRPV1 (1,0 nmol – dose sem efeitos intrínsecos na nocicepção) em camundongos expostos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA bifatorial revelou significância para o fator tempo somente [$F(6,96)=2,4$; $p<0,05$]. O teste post hoc de Duncan confirmou uma diferença entre as LRCs basais (-10 e 0 minutos) bem como na latência registrada 10 minutos antes do tratamento comparada com a latência registrada 10 minutos pós tratamento ($p<0,05$).

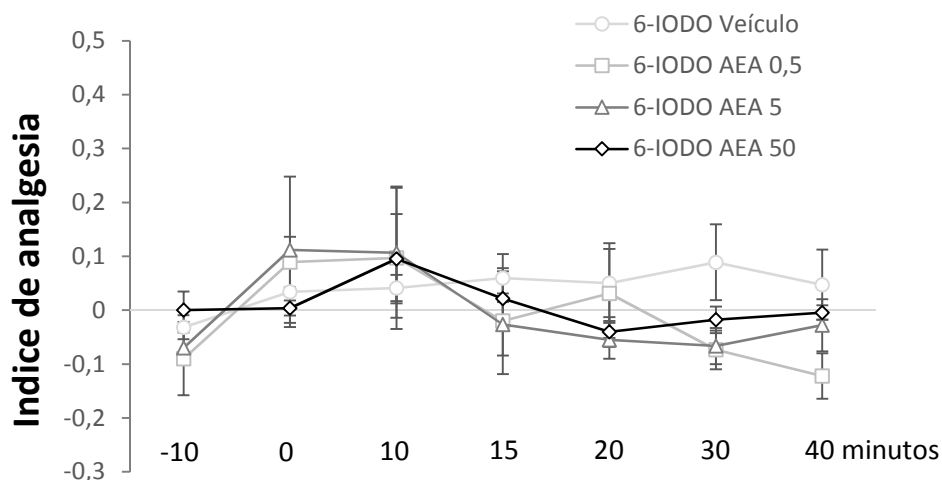


Figura 15: Efeito da microinjeção de 6-IODO seguido de anandamida na LRC de camundongos expostos ao *tail-flick*. N=4-7/grupo. Os pontos no gráfico representam a média ± EPM. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.11. Experimento 3: atenuação da AIE de derrota social através da injeção intra-SCPd dos antagonistas TRPV1 (capsazepina) e CB1 (AM251) em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 16 mostra os efeitos da microinjeção intra-SCPd de AM251 (10 pmol; veículo) ou capsazepina (10 nmol; veículo) em doses desprovidas de efeito intrínseco na nocicepção, na modulação da analgesia induzida pelo estresse de derrota social em camundongos. A ANOVA bifatorial revelou significância nos 2 fatores (tratamento e tempo) e na interação entre eles [tratamento ($F_{3,28}=8,86$); tempo ($F_{6,168}=80,51$); interação ($F_{18,168}=4,23$); $p<0,001$]. O teste post hoc de Duncan confirmou uma atenuação e encurtamento da analgesia induzida pelo estresse de derrota social que durou por 30 minutos nos grupos tratados com AM251 ou capsazepina comparados com seus respectivos grupos veículos ($p<0,05$).

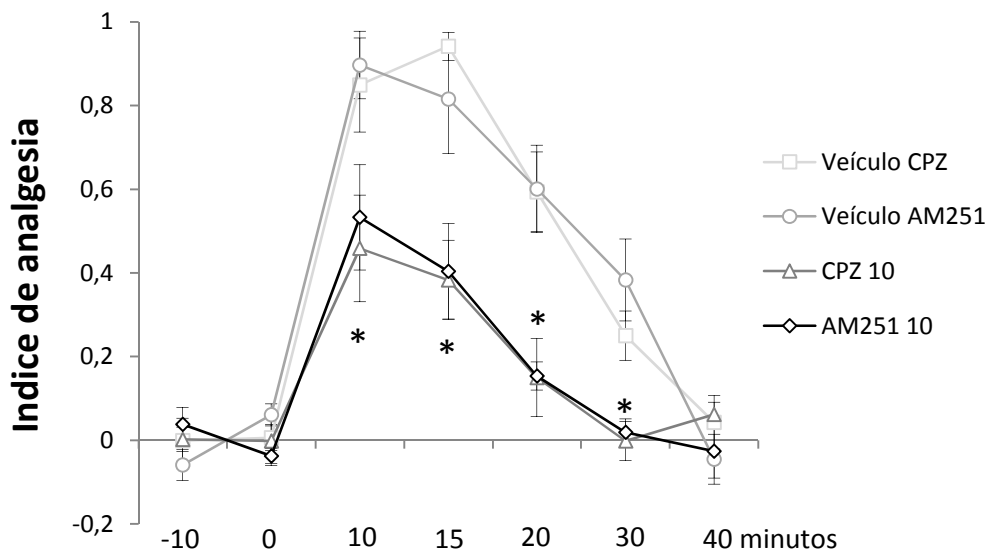


Figura 16: Efeitos da microinjeção intra-SCPd de AM251 ou capsazepina na LRC de camundongos submetidos ao estresse de derrota social e expostos ao teste de *tail-flick*. $N=7-9$ /grupo. Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ comparado com os respectivos grupos veículos. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.12. Experimento 4A: Potencialização da AIE de derrota social através da injeção intra-SCPd de ciclosporina A em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 17 mostra os efeitos da microinjeção intra-SCPd de AM251 (0 ou 10 pmol) seguido de CsA (0,1 μ mol) numa dose desprovida de efeitos intrínsecos na nociceção na modulação da AIE de derrota social em camundongos submetidos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA trifatorial revelou, com exceção do fator pré-tratamento ($F_{1,22}=1,12$; $p>0,05$), diferenças significativas para os fatores tratamento ($F_{1,22}=39,17$; $p<0,05$) e tempo ($F_{6,132}=83,56$; $p<0,05$), bem como para todas as interações entre fatores [pré-tratamento \times tratamento ($F_{1,22}=48,07$); pré-tratamento \times tempo ($F_{6,132}=6,55$); tratamento \times tempo ($F_{6,132}=8,94$); pré-tratamento \times tratamento \times tempo ($F_{6,132}=12,50$); $p<0,001$]. A análise post hoc confirmou uma potencialização e prolongamento da analgesia induzida pelo estresse de derrota social, que durou por 40 minutos, no grupo tratado previamente com AM251 seguido de CsA comparado com seu grupo controle ($p<0,05$). Ainda, o tratamento com AM251, numa dose desprovida de efeito intrínseco na nociceção foi capaz de reverter totalmente a analgesia induzida pelo estresse de derrota social ($p<0,05$).

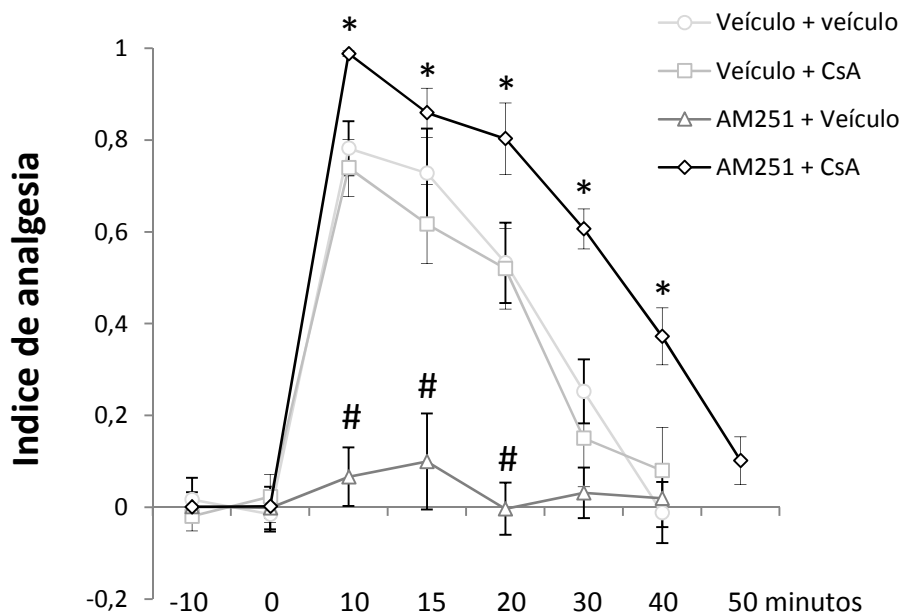


Figura 17: Efeitos da microinjeção intra-SCPd de AM251 ou veículo seguido de CsA na LRC de camundongos submetidos ao estresse de derrota social e expostos ao teste de *tail-flick*. N=6-7/grupo. Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM. *P<0,05 comparado com o grupo veículo + CsA; #P<0,05 comparado com o grupo veículo + veículo. O tempo 0 indica o momento da microinjeção.

4.13. Experimento 4B: Atenuação da potencialização da AIE de derrota social induzida por ciclosporina A intra-SCPd pelo pré-tratamento local com 6-iodo em camundongos expostos ao *tail-flick*.

A Figura 18 revela os efeitos do pré-tratamento intra-SCPd com AM251 (veículo; 10 pmol) ou com uma combinação de AM251/6-iodo (10 pmol/1,0 nmol) seguido por um tratamento local com CsA (0,1 μ mol) na modulação da AIE de derrota social em camundongos submetidos ao teste de *tail-flick*. A ANOVA bifatorial revelou efeitos para o fator pré-tratamento ($F_{2,11}=37,62$; $p<0,05$), fator tempo ($F_{6,66}=37,56$; $p<0,05$) bem como para interação pré-tratamento x tempo ($F_{12,66}=7,67$, $p<0,05$). O teste post hoc de Duncan confirmou a reprodução da potencialização, bem como o prolongamento da AIE de derrota social por 40 min no grupo tratado com AM251 seguido de CsA. Interessantemente, o pré-tratamento com 6-iodo (que foi injetado junto com o AM251 por questões metodológicas) atenuou o efeito da CsA ($p<0,05$).

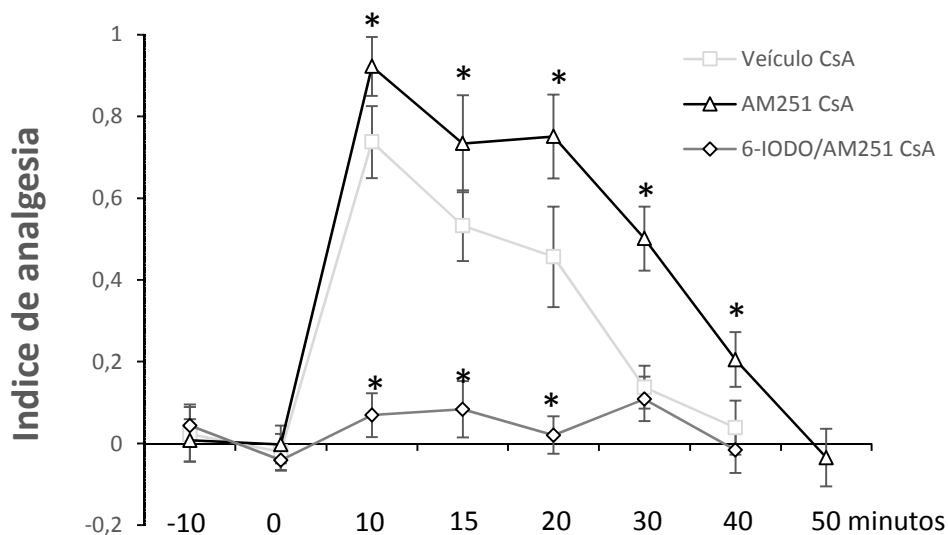


Figura 18: Efeitos da microinjeção intra-SCPd de AM251 ou veículo ou AM251/6-IODO seguido de CsA na LRC de camundongos submetidos ao estresse de derrota social e expostos ao teste de *tail-flick*. N=4-5/grupo. Os pontos no gráfico representam a média \pm EPM. *P<0,05 comparado com o grupo veículo + CsA.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo podem ser divididos em duas categorias para melhor compreensão da discussão; (i) as implicações da anandamida (AEA) exógena na nocicepção que foi publicado na revista *Frontiers in Pharmacology* (artigo disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00695>) e (ii) o papel desse composto no contexto da derrota social.

Sendo assim, a primeira etapa mostra que a AEA (0,5-50 pmol) intra-SCPd não provocou efeitos na nocicepção de camundongos submetidos ao teste de *tail-flick*. Por outro lado, injeções intra-SCPd de agonistas específicos vaniloide (capsaicina; 0,1 e 1 nmol - Exp. 1B) ou canabinoide (WIN; 10 e 50 nmol - Exp. 1C) provocaram antinocicepção via TRPV1 ou CB1, respectivamente. Enquanto o bloqueio *per se* dos receptores CB1 não alterou a resposta nociceptiva (Exp. 1D), a injeção intra-dPAG de 6-IODO (Exp. 1E) ou capsazepina (Exp. 1F), antagonistas TRPV1, produziram um efeito hipernociceptivo. Curiosamente, sob o bloqueio dos receptores CB1, AEA intra-SCPd produziu um efeito antinociceptivo claro e consistente (Exp. 2A). Em contraste, o bloqueio dos TRPV1 não alterou a ausência de efeitos da injeção AEA intra-SCPd na resposta nociceptiva (Exp. 2B). Na segunda etapa, o antagonismo dos receptores TRPV1 ou CB1, através de injeções intra-SCPd de capsazepina ou AM251, respectivamente, atenuou a antinocicepção induzida pelo estresse (AIE) de derrota social. Finalmente, o tratamento intra-SCPd com ciclosporina A (CsA), droga que mantém os TRPV1 fosforilados, i.e. sensíveis à AEA, potencializou e prolongou a AIE de derrota social.

Primeira etapa da discussão: (i) as implicações da anandamida (AEA) exógena na nocicepção.

As injeções intra-SCPd de AEA (0,5-50 pmol), um agonista endocanabinoide/endovaniloide (Zygmunt et al., 1999; Van Der Stelt e Di Marzo, 2004;

Marinelli et al., 2007), não alteraram a LRC de camundongos ao longo dos 40 min do teste de *tail-flick*. Esse resultado inesperado contrasta com achados da literatura, mostrando que injeções intra-SCPvl de doses medianas de URB597 (um inibidor da enzima FAAH), que por sua vez aumenta seletivamente a AEA endógena, levaram a uma analgesia mediada por vaniloides em ratos expostos ao teste de dor plantar (Maione et al., 2006). No entanto, esses autores também relataram que doses locais baixas ou altas do inibidor de FAAH provocaram hiperalgesia mediada por canabinoides (Maione et al., 2006). Com base no presente estudo, a AEA intra-SCPd, atuando especificamente nos substratos canabinoides (Exp. 2B), corroborou a ausência de efeitos locais da AEA (Exp. 1A), sugerindo que as doses deste agonista vaniloide/canabinoide usado no Exp. 1A, por analogia comportamental, parecem também ter estimulado preferencialmente os receptores CB1. De fato, o papel dos substratos canabinoides na nocicepção está sob um debate complexo. Uma possibilidade menos provável pode explicar essa falta de efeito observada no Exp. 1A, considerando uma estimulação combinada de receptores TRPV1/CB1, uma vez que foi demonstrado um efeito nulo após a ativação vaniloide/canabinoide na coluna ventrolateral da SCP (Maione et al., 2006). Nesse sentido, como resultados anteriores do nosso laboratório mostraram uma antinocicepção mediada por vaniloides no SCP dorsal (Mascarenhas et al., 2015), o presente estudo foi realizado em conformidade nesta mesma coluna, numa tentativa de ser consistente com os achados deste laboratório. Essas diferenças de sítio (colunas dorsais versus ventrolaterais) também podem explicar tais discrepâncias.

Para esclarecer o envolvimento dos receptores TRPV1 e CB1 da SCPd na modulação da resposta nociceptiva, este estudo investigou os efeitos de agonistas específicos vaniloides ou canabinoides intra-SCPd na nocicepção de camundongos. Curiosamente, tanto a capsaicina (0,1 e 1 nmol) como o WIN (10 e 50 nmol) intra-SCPd

aumentaram a LRC de camundongos, de maneira dose dependente, sugerindo uma antinocicepção dependente de TRPV1 e CB1, respectivamente. O presente estudo também relatou uma antinocicepção canabinoide tardia após uma injeção local de WIN na menor dose (1 nmol). Em geral, esses resultados corroboram muitos outros estudos que mostram que a capsaicina injetada em várias colunas da SCP provoca antinocicepção em roedores (Palazzo et al., 2002; Starowicz et al., 2007; Mascarenhas et al., 2015), possivelmente facilitando o sistema inibidor descendente. Em relação ao papel do CB1 na modulação da nocicepção, como mostrado atualmente com injeções intra-SCPd de WIN, um grande conjunto de evidências mostrou que os fitocanabinoides (Lichtman e Martin, 1996; Meng et al., 1998), agonistas sintéticos (Meng et al., 1998) e endocanabinoides (Maione et al., 2006) induzem antinocicepção avaliada através de testes de dor aguda. No entanto, resultados contrastantes também foram relatados com manipulações nos TRPV1 e CB1. Por exemplo, a hipernocicepção também foi relatada após a estimulação vaniloide (Starowicz et al., 2007), um efeito atribuído à capacidade de dessensibilização dos receptores TRPV1 (Palazzo et al., 2008). Neste cenário, ou seja, hipernocicepção induzida por vaniloide, apenas altas doses de agonista de TRPV1 seriam suficientes para induzir dessensibilização (Palazzo et al., 2008). Em relação aos efeitos hipernociceptivos dos agonistas CB1, estudos prévios relataram hipernocicepção imediata e tardia quando doses baixas de WIN ou URB597 foram injetadas na SCPvl de ratos (Maione et al., 2006). Este perfil paradoxal de agonistas CB1 parece ser devido à expressão destes receptores em neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos nos circuitos de modulação da dor dessas espécies de murinos (Palazzo et al., 2008).

Conseqüentemente, os Experimentos 1D-F foram realizados a fim de encontrar doses sem efeitos intrínsecos dos antagonistas CB1 e TRPV1 na nocicepção. O Exp. 1D revelou que o AM251, antagonista CB1, intra-SCPd não alterou a resposta nociceptiva

de camundongos submetidos ao teste de *tail-flick*, indicando ausência de tonicidade canabinoide na modulação da dor aguda na SCPd de camundongos. De fato, o sistema canabinoide é recrutado apenas sob demanda de estímulos aversivos, estressores ou nocivos [para uma revisão, veja (Morena e Campolongo, 2014, Ulugol, 2014)]. Ao contrário, os Exps. 1E e 1F mostraram efeitos hipernociceptivos de antagonistas TRPV1 intra-SPCd de camundongos. Deste modo, tanto o 6-IODO (3 nmol) quanto a capsazepina (30 nmol) intra-SPCd diminuíram a LRC, sugerindo um efeito hipernociceptivo e, portanto, um tono endovaniloide modulando a dor aguda na SPCd de camundongos. Starowicz e colaboradores (2007) demonstraram primeiramente uma facilitação endovaniloide tônica na liberação de glutamato na SCP de ratos, uma vez que a 5-iodoresiniferatoxina, um antagonista seletivo de TRPV1, facilitou respostas nociceptivas em modelos de dor aguda. Além disso, outros autores demonstraram que os endovaniloides contribuem para a modulação da ansiedade. Neste contexto, a capsazepina (antagonista TRPV1) intra-SCP atenuou o comportamento defensivo de ratos expostos ao labirinto elevado (Moreira et al., 2007).

A já conhecida antinocicepção media por CB1, encontrada no Exp.1C, parece ser devido à inibição de liberação de GABA por interneurônios da SCP, o que, por sua vez, contribui para a desinibição das eferências antinociceptivas (células *OFF*) da SCP (Moreau e Fields, 1986; Meng et al., 1998; Vaughan et al., 2000). Tal fato contrasta com a ausência de efeitos da AEA preferencialmente nos CB1 descritos nos Exps.1A e 2B. Neste contexto, embora nenhum Experimento tenha avaliado a referida questão, é provável que as doses de AEA tenham estimulado ambas populações de neurônios que expressam CB1 na SCP e a nocicepção tenha sido fisiologicamente contrabalanceada, o que explica a ausência de efeitos. Além disto, o WIN exhibe diferentes aspectos farmacodinâmicos (maior afinidade CB1, portanto menor valor de K_i) e não é hidrolisado

pela FAAH em comparação com a AEA, o que torna difícil a comparação de doses de um agonista CB1 sintético versus endógeno. Além disto, ainda é necessário um considerável esforço para desvendar a participação dos receptores CB1 expressos em neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos, uma vez que, fisiologicamente, os efeitos mediados por canabinoides estão sob modulações antagônicas.

Na tentativa de determinar o papel da AEA exógena ligada preferencialmente nos TRPV1 ou CB1, o Exp. 2 consistiu na avaliação da resposta nociceptiva da AEA intra-SCPd de camundongos previamente tratados com AM251 (10 pmol) ou 6-IODO (1 nmol) locais. Curiosamente, contrastando com os resultados obtidos no Exp.1A, a AEA (5,0 e 50 pmol) produziu um acentuado efeito antinociceptivo apenas sob o bloqueio dos receptores CB1 (Exp. 2A). A AEA, na dose mais alta, provocou um efeito antinociceptivo de elevada magnitude que durou por 20 min, possivelmente por recrutar os TRPV1, corroborando o Exp.1B, que revelou uma antinocicepção induzida por capsaicina. Ao contrário, o bloqueio vaniloide intra-SCPd não revelou qualquer efeito intrínseco da AEA na nocicepção (Exp. 2B). Assim, parece razoável sugerir que as doses de AEA usadas no Exp.1A tenham também estimulado preferencialmente os substratos canabinoides, embora nenhum antagonismo tenha sido realizado. Neste contexto, em termos farmacodinâmicos, a AEA se liga a receptores CB1 com maior afinidade (valor de K_i entre 37 e 116 nM) em comparação com os TRPV1 (valor de K_i 1,66 μ M) (Ross et al., 2001). Portanto, o Experimento 1A parece corroborar a maior afinidade da AEA pelos receptores CB1 a nível comportamental, pois revelou o mesmo resultado do Experimento 2B.

Neste contexto, foi demonstrado que a AEA também pode atuar através de outros canais iônicos, como os receptores de 5-HT₃ e glicina, o que potencialmente poderia contribuir para os efeitos induzidos por AEA na nocicepção. No entanto, o papel da AEA

nos receptores 5-HT₃ depende muito da abundância deste receptor na superfície celular de locais específicos do cérebro (Barann et al., 2002; Xiong et al., 2008). Além disso, a AEA parece aumentar a depuração da glicina na fenda sináptica (Pearlman et al., 2003), que, fisiologicamente, pode prejudicar a corrente excitadora dependente de NMDA e, por extensão, a antinocicepção induzida por AEA que depende da liberação de glutamato em células *OFF* do RVM. Estas evidências enfraqueceram a preocupação com a potencial influência de outros canais nos efeitos de AEA em conjunto com o fato de que vários autores apontam a relevância dos receptores CB₁/TRPV₁ na mediação dos efeitos induzidos pela AEA (Zygmunt et al., 1999; Vaughan et al. 2000, Fenwick et al., 2017). Em outras palavras, essas evidências reforçam o fato de que os Exps. 2A e B, de fato, levaram a AEA a se ligar com especificidade nos TRPV₁ e CB₁, respectivamente.

De acordo com nossa primeira hipótese, a antinocicepção induzida por AEA parece ser reproduzida quando esse composto é vetorizado nos substratos vaniloides, onde apenas a dessensibilização deve ser evitada. Em outras palavras, controlando a quantidade de endovaniloide que estimula os receptores TRPV₁, a AEA irá provocar antinocicepção, possivelmente pelo recrutamento do sistema inibitório descendente, como discutido acima. Em contraste, objetivando estudar a antinocicepção mediada por CB₁, é preciso levar em conta a complexa neurofisiologia dos substratos canabinoides na SCPd, onde ambos os neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos expressam receptores CB₁.

Com efeito, no Exp.1, as doses de AEA (0,5-50 pmol) foram um pouco dissonantes daquelas utilizadas para capsaicina (0,01-1 nmol). Por um lado, isto pode enfraquecer o nosso estudo em vista de suas diferentes afinidades para TRPV₁ (AEA exibe menor afinidade para TRPV₁ do que a capsaicina) e, portanto, doses mais alta de AEA assim como doses mais baixas de capsaicina deveriam ter sido consideradas. No

entanto, por outro lado, isto fortalece o fato de que uma dose muito baixa de AEA foi capaz de induzir antinocicepção via TRPV1 sob bloqueio de receptores CB1 locais (Exp. 2A), corroborando a hipótese de que, dependendo dos receptores (isto é, TRPV1 ou CB1), AEA pode provocar um efeito antinociceptivo claro e potente.

Finalmente, é provável que uma gama mais ampla de doses de AEA no Exp. 2B levaria a um efeito diferente deste composto se ligando preferencialmente nos substratos canabinoides, uma vez que as doses de AEA determinam os efeitos mediados pelo CB1. No entanto, analisando os efeitos do Exp. 2A, os dados atuais sugerem uma metodologia interessante para abordar os efeitos da AEA exógena na nocicepção (ou seja, vetorizando a AEA nos substratos vaniloides) e, eventualmente, permitindo ensaios clínicos que até agora parecem não traduzir para os seres humanos o potencial que os canabinoides (por exemplo, anandamida) possuem na modulação da dor.

Segunda etapa da discussão: (ii) o papel da AEA no contexto da derrota social.

Os resultados do Experimento 3 sugerem uma participação parcial tanto do sistema vaniloide quanto do canabinoide na modulação da AIE de derrota social, uma vez que, os camundongos tratados intra-SCPd com capsazepina (10 nmol) ou AM251 (10 pmol), em doses desprovidas de efeitos intrínsecos na nocicepção (ver Experimentos 1D e 1F), atenuaram e encurtaram a analgesia de elevada magnitude eliciada pelo confronto com um coespecífico. É interessante destacar, no entanto, que outros sistemas de neurotransmissores, por exemplo, serotonina (De Freitas et al., 2014) e opioides (Wilson-Poe et al., 2013; Garzón et al., 2015) localizados na SCP também têm implicações na modulação da nocicepção e em várias formas de AIE. Neste contexto, esperava-se que a intervenção farmacológica, através da utilização de um antagonista TRPV1 ou CB1, em

sistemas específicos de neurotransmissores (vaniloide e canabinoide, respectivamente), iria apenas atenuar ao invés de reverter completamente a AIE derrota social, uma vez que, outros potenciais neurotransmissores poderiam ainda contribuir para a referida analgesia. Corroborando essa ideia, foi mostrado que a analgesia induzida pela exposição de camundongos à um labirinto todo aberto (LCE aberto), previamente submetidos ao teste de formalina na pata, foi atenuada em aproximadamente 20% com o tratamento da capsazepina (antagonista TRPV1), apontando uma possível contribuição de outros sistemas de neurotransmissores, além dos vaniloides, nesse fenômeno (MASCARENHAS et al., 2015). Portanto, parece-nos razoável conjecturar que a injeção combinada com ambos antagonistas intra-SCPd resulte na somação ou potencialização de efeitos sobre AIE de derrota social.

Outros pesquisadores já demonstraram que o sistema canabinoide da SCP de ratos modula outro tipo de AIE, neste caso o estímulo estressor sendo o choque na pata. Olango e colaboradores (2012) mostraram que a administração de rimonabanto (antagonista/agonista inverso CB1) atenua a analgesia induzida pelo medo condicionado (FCA – do inglês *fear-conditioned analgesia*) em ratos submetidos ao estresse de choque na pata (Olango et al., 2012). Ainda, Suplita e colaboradores (2005) afirmaram que a AIE de choque na pata não é dependente de TRPV1, dado que a administração de capsazepina (antagonista TRPV1) sistêmica falhou em atenuar esse tipo de AIE (Suplita et al., 2005). Entretanto, o presente estudo foi capaz de mostrar um papel dos TRPV1 e CB1 da SCPd de camundongos na modulação da AIE de derrota social, sugerindo que o papel da neurotransmissão vaniloide em particular é do tipo estresse dependente.

Evidências do nosso laboratório mostraram que dependendo o tipo de estresse associado com a inibição do córtex pré-frontal medial, é possível detectar efeitos ansiogênicos 24h após o estímulo estressor (COSTA et al., 2016). De fato, Canteras e

Motta (2015) demonstraram que o padrão de ativação neuronal pode variar entre animais imobilizados em comparação com animais socialmente derrotados (Canteras; Motta, 2015). No caso do trabalho de Suplita (2005) e Olango (2012), que mostraram ausência de influência do sistema vaniloide na AIE de choque na pata, o estresse em questão foi diferente do utilizado no presente estudo, portanto, especulamos que também neste caso a ativação neuronal possa ser diferente entre animais submetidos ao estresse de choque na pata em comparação com animais derrotados socialmente, uma vez que o sistema vaniloide parece participar da AIE da derrota social, mas não na AIE de choque na pata.

Finalmente, o Exp. 4 contribuiu para avaliar a participação dos canais TRPV1 fosforilados (i.e. sensíveis aos endovaniloides) na modulação da AIE de derrota social. Antes, contudo, foi realizado o Experimento 1G que teve a finalidade de revelar doses desprovidas de efeitos intrínsecos da ciclosporina A (CsA), um inibidor da fosfatase 2B (enzima responsável por desfosforilar o canal TRPV1) administrada intra-SCPd em camundongos expostos ao *tail-flick*. A CsA na dose mais alta (1 μ mol) aumentou o índice de analgesia dos animais sugerindo um efeito antinociceptivo. Numa minuciosa pesquisa literária, parece ainda não haver resultados sobre os efeitos intrínsecos desse composto na modulação da dor aguda. Sendo assim, o efeito antinociceptivo da CsA, a qual mantém os receptores vaniloides fosforilados e, portanto, sensíveis à ligantes endógenos, possivelmente ocorre por estimulação dos TRPV1. Contudo, não podemos excluir um efeito da fosfatase 2B no tono fisiológico que previne a dor, uma vez que o mecanismo de ação da CsA é inibi-la. De fato, o uso crônico de inibidores da calcineurina, como exemplo a CsA, é imperativo em pacientes transplantados por se tratar de potentes imunossupressores (Mohideen; Wu, 2017), entretanto, a longo prazo, raros casos de uma síndrome de hipernocicepção induzida por inibidores de calcineurina já foi reportada sendo sua etiologia ainda desconhecida (Mohideen; Wu, 2017; Watanabe et al., 2017).

Ainda, podemos salientar que a sensibilização farmacológica dos TRPV1, o que não reflete uma situação fisiológica, acarrete em estimulações inespecíficas destes receptores. Um Experimento envolvendo o pré-tratamento intra-SCPd com um antagonista TRPV1 poderia responder se a antinocicepção induzida pela CsA local é devido à ação agonista de algum eventual endovaniloide. Embora atraente, essa hipótese não foi o foco do presente estudo.

É sabido que o estresse de choque na pata libera endocanabinoides na SCPd de ratos (Hohmann et al., 2005). Além do 2-Aracdonoil-Glicerol (2-AG), a AEA também é liberada diante uma situação de estresse de choque na pata (Hohmann et al., 2005) e foi o foco do presente estudo por se tratar de um agonista ambivalente e estimular também o sistema vaniloide. Portanto, parece razoável sugerir que o estresse de derrota social libera AEA nesta região límbica de camundongos. Neste contexto, foi realizada a prévia administração intra-SCPd de AM251 (antagonista CB1), seguida da CsA, na intenção de investigar o potencial papel da AEA endógena liberada durante a derrota social, preferencialmente nos TRPV1 fosforilados (Exp.4A). Desta forma, a fosforilação intra-SCPd dos receptores TRPV1 potencializou e prolongou a AIE de derrota social via sistema vaniloide. Neste contexto experimental, os canais TRPV1 encontravam-se sensíveis a AEA devido ao tratamento com CsA (10 pmol – dose sem efeitos intrínsecos na nocicepção) e a mesma poderia se ligar preferencialmente nos substratos vaniloides, uma vez que os receptores CB1 encontravam-se antagonizados (Exp. 4A). Portanto, a fosforilação dos TRPV1 parece ter superado a atenuação que o bloqueio dos receptores CB1 provocam sobre a AIE de derrota social mostrados nos Exps. 3 e 4A, sugerindo um papel muito proeminente desse mecanismo molecular de fosforilação na responsividade dos TRPV1 num contexto de estresse. Em outras palavras, o bloqueio dos substratos canabinoides intra-SCPd, que atenua a AIE de derrota social (Exp. 3), foi totalmente

superado pelo tratamento local de CsA, que por sua vez potencializou e prolongou a AIE de derrota social via substratos vaniloides. Além disto, no Exp. 4A o antagonista canabinoide AM251 não reproduziu o efeito revelado no Exp. 3 e, portanto, reverteu completamente a AIE de derrota social ao invés de atenuá-la. Cabem destacar alguns fatores que podem ajudar a explicar tal discrepância como as diferenças individuais entre os sujeitos e também diferenças no protocolo experimental, uma vez que, no caso do Exp. 4A, foram realizadas duas microinjeções e a intensidade do estímulo térmico na cauda foi maior em comparação com o Exp. 3 para detectar um efeito de potencialização da AIE.

O Experimento 4B, que teve o intuito de revelar se a potencialização da AIE de derrota social induzida pela CsA era decorrente de ativação TRPV1 ou a uma participação da calcineurina (enzima inibida pela CsA) neste fenômeno. Neste sentido, o Exp.4B reproduziu a potencialização e o prolongamento da AIE de derrota social pelo tratamento intra-SCPd de CsA em animais previamente tratados com AM251 local. De maneira interessante, o bloqueio dos receptores TRPV1 reverteu totalmente o efeito da CsA, sugerindo que, de fato, a potencialização se dá por estimulação vaniloide e não por um papel da calcineurina na AIE de derrota social. Ainda foi possível comprovar a hipótese levantada acima de que ambos antagonistas se somariam e atenuariam a AIE de derrota social com maior magnitude. Neste sentido, a injeção combinada de AM251/6-IODO seguida de CsA reverteu completamente a analgesia induzida pela derrota social, sugerindo que ambos os substratos vaniloide/canabinoide contribuem significativamente nesse fenômeno de analgesia. Por fim, parece que o papel dos TRPV1 da SCPd de camundongos na AIE de derrota social é dependente do seu estado fosforilado. Na literatura, este parece ser o primeiro trabalho que investiga, através de ferramentas farmacológicas, o papel dos canais TRPV1 fosforilados na modulação da AIE.

6. CONCLUSÕES

O atual estudo parece ser o primeiro a demonstrar um efeito antinociceptivo da AEA exógena na SCPd de camundongos. Até onde sabemos, este também foi o primeiro estudo a demonstrar um papel da AEA endógena na AIE de derrota social que pode ser potencializada com a fosforilação dos TRPV1. Em conclusão, o sistema vaniloide parece ter um papel muito proeminente no efeito antinociceptivo agudo da AEA exógena. Além disto, a AEA endógena é importante para a inibição da dor num contexto de estresse social via receptores TRPV1/CB1, e os mecanismos de fosforilação dos TRPV1 parecem ser cruciais para a magnitude e duração deste fenômeno.

7. REFERÊNCIAS

- AKOPIAN, A.N.; RUPAREL, N.B.; JESKE, N.A.; PATWARDHAN, A.; HARGREAVES, K.M. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol Sci.* v.30, p.79-84, 2009.
- ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K.G.; CARVALHO, M.C.; BRANDÃO, M.L. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. *Neuroscience.* Oxford, v.164, n.2, p.387-397, 2009.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research, Amsterdam,* v.1000, p.40-56, 2004.
- ARCHER, S.; HARRIS, L.S. Narcotic antagonists. *Fortschr Arzneimittelforsch* v.8, p.261–320, 1965.
- BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in midbrain periaqueductal gray: modules of emotional expression? *Trends Neurosci,* New York, v.17, n.9, p.379-389, 1994.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behav Brain Res.* Amsterdam, v.15, n.2, p.107-119, 1985.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control system: brainstem spinal pathways and endorphin circuits. *Annu Ver Neurosci.* Palo Alto, v.7, p.309-338, 1984.
- BAUMANN, T.J.; STRICKLAND, J. Pain Management. In: DIPIRO, J.T; TALBERT, R.L; YEE, C.G; POSEY, L.M. *Pharmacotherapy “A Pathophysiologic Approach.* 7th ed. The Macgraw-Hill Companies: USA, 2008, p.989.
- BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology,* New York, v.46, n.6, p.575-605, 1995.
- BEITZ, A.J. Central Gray. In: Paxinos G. *The human nervous system.* Academic Press, New York, 1990.
- BHAVE, G.; HU, H.J.; GLAUNER, K.S.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D.J. et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.100, n.21, p.12480–12485, 2003.
- BHAVE, G.; ZHU, W.G.; WANG, H.B.; BRASIER, D.J.; OXFORD, G.S.; GEREAU, R.W. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* v.35, n.4, p.721–731, 2002.
- BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. *Physiol. Behav.,* v.73, n.3, p.435-442, 2001.
- BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and Brain Sciences,* Amsterdam, v. 3, p. 291-322, 1980.
- BOND, M. R. Psychiatry disorders and pain. In: McMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). *WALL and MELZACK’S Textbook of pain.* 5th ed. Churchill: Elsevier 2006.
- BRANDÃO, M.L.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA mediation of the antiaversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav.* Phoenix, v.16, n.3, p.397-402, 1982.
- BROOKS, J.; TRACEY, I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J Anat,* v.207, p.19-33, 2005.
- BURSTEIN, R.; FALKOWSKY, O.; BORSOOK, D.; STRASSMAN, A. Distinct lateral and medial projections of the spinothalamic tract of the rat. *J. Compar. Neurol.* Philadelphia, v.373, p.549-574, 1996.

- CAMPOS, K.F.; AMARAL, V.C.; RICO, J.L.; MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. *Behav Brain Res. Amsterdam*, v.240, p.160-170, 2013.
- CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Bihav* 71:481-491, 2002.
- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional significance and neuronal organization. *Behav Brain Res, Amsterdam*, v.58, n.1-2, p.27-47, 1993.
- CARVALHO-NETTO, E.F.; GOMES, K.S.; AMARAL, V.C.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. *Psychopharmacology*. v.204, p.617-625, 2009.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. "The capsaicin receptor: a heatactivated ion channel in the pain pathway," *Nature*, v.389, n.6653, p.816–824, 1997.
- CERVERO, F. *Neurobiología del dolor. Revista de Neurología, Barcelona*, v.30, n.6, p.551-555, 2000.
- CORNÉLIO, A.M.; MENDES-GOMES, J.; FUGIMOTO, J.S.; MORGAN, M.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Environmentally induced antinociception and hyperalgesia in rats and mice. *Brain Res, Amsterdam*, v.1415, p.56-62, 2011.
- CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? *Physiol Behav, Oxford*, v.96, n.3, p.440-447, 2009.
- CORTRIGHT, D.N.; SZALLASI, A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur. J. Biochem.* v.271, n.10, p.1814–1819, 2004.
- COSTA, N.S., VICENTE, M.A., CIPRIANO, A.C., MIGUEL, T.T., NUNES-DE-SOUZA, R.L., Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? *Neuropharmacology* (2016) doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.04.011
- CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Differential projections of thermoreceptive and nociceptive lamina I trigeminothalamic and spinothalamic neurons in the cat. *J Neurophysiol. Washington*, v.86, n.2, p.856-870, 2001.
- CRISTINO, L.; DE PETROCELLIS, L.; PRYCE, G.; BAKER, D.; GUGLIELMOTTI, V.; Di MARZO, V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, v.139, p.1405-1415, 2006.
- DARWIN, C. *The expression of emotion in man and animals. Chicago: The University of Chicago Press*, 1965.
- DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY, P.T.; OVEREND, P. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, v.405, p.183-187, 2000.
- DE FREITAS RL, DE OLIVEIRA RC, DE OLIVEIRA R, PASCHOALIN-MAURIN T, DE AGUIAR CORRÊA FM, COIMBRA NC: The role of dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal gray matter and in situ 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonergic receptors in post-ictal antinociception. *Synapse [Internet]* 68:16–30, 2014.
- DEAKIN, J. F. W; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. *J. Psychopharmacol., Oxford*, v.5, n.4, p.305-315, 1991.
- DOCHERTY, R.J.; YEATS, J.C.; BEVAN, S.; BODDEKE, H.W. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch.* v.431, n.6, p.828–837, 1996.

- FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON. Neurotransmitter in nociceptive modulatory circuits. *Annual Review of Neuroscience*, Palo Alto. v.14, p. 219-45, 1991.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central Nervous System Mechanisms of pain modulation. In: MCMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). *Wall and Melzack's textbook of pain*. 5th edition, Churchill Livingstone: Elsevier, 2006, p. 125-142.
- FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; MOREIRA, F.A.; GUIMARÃES, F.S. The endocannabinoid and vanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology*. v. 63, n. 2, p. 202-10, 2012.
- GARZON J., HERRERO-LABRADOR R., RODRIGUEZ-MUÑOZ M., SHAH R., VICENTE-SANCHEZ A., WAGNER C.R., et al., HINT1 protein: a new therapeutic target to enhance opioid antinociception and block mechanical allodynia, *Neuropharmacology* 89 (2015) 412–423.
- GEWEHR, C.; DA SILVA, M.A.; DOS SANTOS, G.T.; ROSSATO, M.F.; DE OLIVEIRA, S.M.; DREWES, C.C. et al. Contribution of peripheral vanilloid receptor to the nociception induced by injection of spermine in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. v.99, p.775-781, 2011.
- GRAEFF, F.G. Brain defense system and anxiety. In: ROTH, M.; BURROWS, G. D.; NOYES, R. (eds.) *Handbook of anxiety*, Vol 3, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1990, p.307-354.
- GRAEFF, F.G. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. *Braz J Med Biol Res*. v.45, n.4, p.366-375, 2012.
- GRUMBACH, L. The prediction of analgesic activity in man by animal testing, in *Pain*, 15th International Symposium, Detroit, 1964 (Knighton, R.S.; Dumke, P.R. eds) pp 163–182, 1966, Little Brown, Boston.
- GUIMARÃES, F.S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; DE LUCCA, A.C. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev*. Fayetteville, v.29, n.8, p.1313-1322, 2005.
- HARRIS, J.A. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. *Journal of Physiology*, Paris, v. 90, n.1, p.15-25, 1996.
- HEINRICHER, M.M.; MARTENSON, M.E.; NEUBERT, M.J. Prostaglandin E2 in the midbrain periaqueductal gray produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla. *Pain*. Amsterdam v.110, n.1-2, p.419-426, 2004.
- HOHMANN, A.G.; SUPLITA, R.L.; BOLTON, N.M.; NEELY, M.H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R. et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*. London, v.435, n.7045, p.1108-1112, 2005.
- JACOBSON, L.H.; BETTLER, B.; KAUPMANN, K.; CRYAN, J.F. Behavioral evaluation of mice deficient in GABA(B(1)) receptor isoforms in tests of unconditioned anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*., Berlin, v.190, n.4, p.541-553, 2007.
- JIN, X.; MORSY, N.; WINSTON, J.; PASRICHA, P.J.; GARRETT, K.; AKBARALI, H.I. Modulation of TRPV1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-Src kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. v.287, n.2, p.C558–C563, 2004.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, London, v.413, p.203-210, 2001.
- JUNG, J.; SHIN, J.S.; LEE, S.Y.; HWANG, S.W.; KOO, J.; CHO, H. et al. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺ /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol. Chem*. v.279, n.8, p.7048–7054, 2004.

- KAVALIERS, M. Brief exposure to a natural predator, the short-tail weasel, induces benzodiazepines sensitive antinociception in white-footed mice. *Physiol Behav*, New York, v.43, n.2, p.187-193, 1988.
- KEENEY, A.J.; HOGG, S. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. *Behav. Pharmacol.*, v.10, n.8, p.753–764, 1999.
- KOMATSU, H.; OHARA, A.; SASAKI, K.; ABE, H.; HATTORI, H.; HALL, F.S. et al. Decreased response to social defeat stress in μ -opioid-receptor knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav. Phoenix*, v.99, n.4, p.676-682, 2011.
- KRISHNAN, V.; HAN, M.H.; GRAHAM, D.L.; BERTON, O.; RENTHAL, W.; RUSSO, S.J. et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, v.131, p.391–404, 2007.
- LAVIOLA, G.; ADRIANI, W.; TERRANOVA, M.L.; GERRA, G. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.23, n.7, p.993-1010, 1999.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, v. 53, n. 4, p. 597-632, 2001.
- LEE, C.; RODGERS, R. J. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. *Behav. Pharmacol.* v. 2, p.491-496, 1991.
- LESTER, L.S.; FANSELOW, M.S. Exposure to a cat produces opioid antinociception in rats. *Behav Neurosci*, Washington DC, v.99, n.4, p.756-759, 1985.
- LICHTMAN, A.H; MARTIN, B.R. (1996). Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology (Berl)* 126, 125-131.
- LIZANECZ, E.; BAGI, Z.; PASZTOR, E.T.; PAPP, Z.; EDES, I.; KEDEI, N. et al. Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. *Mol. Pharmacol.* v.69, n.3, p.1015–1023, 2006.
- MAIONE, S.; STARROWICZ, K.; PALAZZO, E.; ROSSI, F.; Di MARZO, V. The endocannabinoid and endovanilloid systems and their interactions in neuropathic pain. *Drug Dev Res* v.67, p.339-354, 2006.
- MAIONE, S.; BISOGNO, T.; de NOVELLIS, V.; PALAZZO, E.; CRISTINO, L.; VALENTI, M. et al. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, Baltimore, v.316, n.3, p.969-982, 2006.
- MANTHY, P.H. The midbrain periaqueductal gray in rat, cat and monkey: a nissl, weiss and golgi analysis. *The J. Comp Neurol*, v.204, p.146-158, 1982.
- MARINELLI, S.; Di MARZO, V.; FLORENZANO, F. et al., “Narachidonoyl- dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors,” *Neuropsychopharmacology*, v.32, n.2, p.298–308, 2007.
- MASCARENHAS, D.C; GOMES, K.S; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice. *Behavioural brain research*. 2013;250:308-15.
- MASCARENHAS, D.C; GOMES, K.S; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Role of TRPV1 channels of the dorsal periaqueductal gray in the modulation of nociception and open elevated plus maze-induced antinociception in mice. *Behavioural brain research*. 2015; 292:547-54.

- McGARAUGHTY, S.; CHU, K.L.; BITNER, R.S. et al., "Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM," *J Neurophysiol*, v.90, n.4, p.2702–2710, 2003.
- MELLO, R.D.; DICKENSON A.H. Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*. v. 101, p. 1-9, 2008.
- MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. *Brain Res, Amsterdam*, v.1047, n.1, p.97-104, 2005
- MENG ID, MANNING BH, MARTIN WJ, FIELDS HL: An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature [Internet]* 395:381–3, 1998.
- MENG, I.D; JOHANSEN, J.P. (2004). Antinociception and modulation of rostral ventromedial medulla neuronal activity by local microinfusion of a cannabinoid receptor agonist. *Neuroscience* 124, 685-693.
- MEZEY, É.; TÓTH, Z.E.; CORTRIGHT, D.N. et al., "Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, n.7, p.3655–3660, 2000.
- MICZEK, K.A.; WEERTS, E.; HANEY, M.; TIDEY, J. Neurobiological mechanisms controlling aggression: preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.18, n.1, p.97-110, 1994.
- MICZEK, K.A.; THOMPSON, M.L.; SHUSTER, L. Analgesia following defeat in an aggressive encounter: development of tolerance and changes in opioid receptors. *Ann N Y Acad Sci. New York*, v.467, p.14-29, 1986.
- MICZEK, K.A.; THOMPSON, M.L.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science. New York*, v.215, n.4539, p.1520-1522, 1982.
- MIGUEL, T.T., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. *Brain Res. Amsterdam*, v.1240, p.39-46, 2008.
- MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Res*. v.1076, n.1, p.42–48, 2006.
- MIGUEL, T.T.; GOMES, K.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Contrasting effects of nitric oxide and corticotropin- releasing factor within the dorsal periaqueductal gray on defensive behavior and nociception in mice. *Braz J Med Biol Res*. v.45, n.4, p.299-307, 2012.
- MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic and antinociceptive effects induced by corticotropin-releasing factor (CRF) injections into the periaqueductal gray are modulated by CRF1 receptor in mice. *Horm Behav. New York*, v.60, n.3, p.292-300, 2011.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, Amsterdam, v.57, n.1, p. 1-164, 1999.
- MILLAN, M.J.; BROCCO, M.; GOBERT, A.; DOREY, G.; CASARA, P.; DEKEYNE, A. Anxiolytic properties of the selective, non-peptidergic CRF(1) antagonists, CP154,526 and DMP695: a comparison to other classes of anxiolytic agent. *Neuropsychopharmacology. New York*, v.25, n.4, p.585-600, 2001.
- MITCHELL, D.; HELLON, R.F. Neuronal and behavioral responses in rats during noxious stimulation of the tail. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* v.197, p.169–194, 1977.
- MOHAPATRA, D.P.; NAU, C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*. v.280, n.14, p.13424–13432, 2005.

- MORAES, C.L.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A.P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res. Amsterdam*, v.194, n.2, p.181-186, 2008.
- MOREAU, J.L; FIELDS, H.L. (1986). Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. *Brain Res* 397, 37-46.
- MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.;CAMPOS, A.C.; LISBOA, S.F.; TERZIAM, A.L.; RESSTEL, L.B.; GUIMARÃES, F.S. Antiaversive Effects of Cannabinoids: Is the Periaqueductal Gray Involved? Hindawi Publishing Corporation. *Neural Plasticity* Volume 2009, Article ID 625469, 11 pages
- MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology*. v.52, n.3, p.958-965, 2007.
- MORENA M, PATEL S, BAINS JS, HILL MN: Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. *Neuropsychopharmacology* [Internet] Nature Publishing Group; 41:80–102, 2016
- MOTTA SC, CANTERAS NS. Restraint stress and social defeat: What they have in common. *Physiol Behav*. 146:105-110, 2005.
- NETTO, C.A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induce by exposure to a novel environment in rat: effects of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol, New York*, v.48, n.2, p.304-309, 1987.
- NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacol Biochem Behav*. Phoenix, v.52, n.1, p1-6 1995.
- PALAZZO, E.; de NOVELLIS, V.; MARABESE, I. et al., “Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception,” *European Journal of Pharmacology*, v.439, n.1–3, p.69–75, 2002.
- PALAZZO, E.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. *Mol. Cell. Endocrinol. Amsterdam*, v.286, p.79-83, 2008.
- PATWARDHAN, A.M.; SCOTLAND, P.E.; AKOPIAN, A.N.; HARGREAVES, K.M. Activation of TRPV1 in the spinal cord by oxidized linoleic acid metabolites contributes to inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A. Washington, DC*, v.106, n.44, p.18820-18824, 2009.
- PEARCE; L.V.; TÓTH, A.; RYU, H.; KANG, D.W.; CHOI, H.K.; JIN, M.K. et al. Differential modulation of agonist and antagonist structure activity relations for rat TRPV1 by cyclosporin A and other protein phosphatase inhibitors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. v.377, n.2, p.149-157, 2008.
- PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, S. E; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, Amsterdam, v.14, p.149-167, 1985.
- REYNOLDS, D. V. Surgery in rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. *Science*, v. 164, p. 444-445, 1969.
- RODGERS, R.J. Neuropharmacological Aspects of Adaptive Pain Inhibition in Murine “Victims” of Aggression. *Aggressive Behavior*, New York, v.21, p.29-39, 1995.
- RODGERS, R.J.; LEE, C.; SHEPHERD, J.K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology*, v. 106, p.102-110, 1992.
- RODGES, R.J.; RANDALL, J.I. Resident’s Scent: a critical factor in acute analgesic reaction in defeat experience in male mice. *Physiol Behav*, New York, v.37, n.2, p.317-322, 1986.

- ROSS, R.A., GIBSON, T.M., BROCKIE, H.C., LESLIE, M., PASHMI, G., CRAIB, S.J., DI MARZO, V., AND PERTWEE, R.G. (2001). Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 132, 631-640.
- SCHMITT, R.; KAPEZINSKI, F. Transtorno de ansiedade generalizada. In: HETEM, L.A.B; GRAEFF, F. G. (Ed.). *Transtornos de ansiedade*. Sao Paulo: Atheneu, 2004. p.265-283.
- SEWARDS, T.V.; SEWARDS, M.A. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neurosci Behav Rev*, v.26, n.5 p.553-579, 2002.
- SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H.R.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. *Neurosci Biobehav Rev*. Fayetteville, v.14, n.4, p.481-90, 1990.
- SLUGG, R.M.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Response of cutaneous A- and C-fiber nociceptors in the monkey to controlled-force stimuli. *J Neurophysiol*. v.83, n.4, p.2179-2191, 2000.
- STAROWICZ, K.; MAIONE, S.; CRISTINO, L.; PALAZZO, E.; MARABESE, I.; ROSSI, F. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J Neurosci*. Baltimore, v.27, n.50, p.13739-13749, 2007.
- STEIN, D.J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. *Journal of Anxiety Disorders*., v.11, n.4, p.409-429, 1997.
- SUPLITA, R.L.; FARTHING, J.N.; GUTIERREZ, T.; HOHMANN, A.G. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology*. Oxford , v.49, n.8, p.1201-1209, 2005.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms," *Pharmacology Reviews*, v.51, n.2, p.159–212, 1999.
- TAKAHASHI, L.K.; HO, S.P.; LIVANOV, V.; GRACIANI, N.; ARNERIC, S.P. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. *Brain Res*. Amsterdam, v.902, n.2, p.135-142, 2001.
- TALBOT, S.; DIAS, J.P.; LAHJOUJI, K.; BOGO, M.R.; CAMPOS, M.M.; GAUDREAU, P. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional kinin B(1) receptor in rat spinal cord microglia. *J Neuroinflammation*. v.20, p.9:16, 2012.
- TERZIAN, A.L.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S.; MOREIRA, F.A. Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *European Neuropsychopharmacology* v.19, p.188–195, 2009.
- TESKEY, G.C.; KAVALIERS, M. Aggression, defeat and opioid activation in mice: influences of social factors, size and territory. *Behav Brain Res*., Amsterdam, v.23, n.1, p.77-84, 1987.
- THOMPSON, M.L.; MICZEK, K.A.; NODA, K.; SHUSTER, L.; KUMAR, M.S. Analgesia in defeated mice: evidence for mediation via central rather than pituitary or adrenal endogenous opioid peptides. *Pharmacol Biochem Behav.*, Phoenix, v.29, n.3, p.451-456, 1988.
- TILLMAN, D.B., TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: estimates of receptor depth and threshold. *J Physiol*. v.485, p.753-765 1995

- TORRES, I.L.; VASCONCELLOS, A.P.; SILVEIRA CUCCO, S.N.; DALMAZ, C. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v.34, n.2, p.241-244, 2001.
- TÓTH A, BLUMBERG PM, BOCZÁN J. Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam Horm*. 2009;81:389-419.
- ULUGOL, A. (2014). The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. *Balkan Med J* 31, 115-120.
- VALZELLI, L. (Ed). *Psychobiology of aggression and violence*. New York: Raven Press, 1981.
- VAN DER STELT, M.; Di MARZO, V. "Endovanilloids: putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels," *European Journal of Biochemistry*, v.271, n.10, p.1827–1834, 2004.
- VAUGHAN, C.W., CONNOR, M., BAGLEY, E.E., AND CHRISTIE, M.J. (2000). Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 57, 288-295.
- VOLKE, V.; WEGENER, G.; VASAR, E. Augmentation of the NO-cGMP cascade induces anxiogenic-like effect in mice. *J Physiol Pharmacol*. Krakow, v.54, n.4, p.653-660, 2003
- WALL and MELZACK'S Textbook of pain. 5th ed. Churchill: Elsevier 2006.
- WANG, Y.; KEDEI, N.; WANG, M.; WANG, Q.J.; HUPPLER, A.R.; TÓTH, A. et al. Interaction between protein kinase C α and the vanilloid receptor type 1. *J. Biol. Chem.* v.279, n.51, p.53674–53682, 2004.
- WILSON-POE AR, MITCHELL VA, VAUGHAN CW: Postsynaptic mGluR mediated excitation of neurons in midbrain periaqueductal grey. *Neuropharmacology* [Internet] 66:348–54, 2013.
- XING, J.; LI, J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J Neurophysiol*, v.97, p.503-11, 2007.
- YEN, C.Y.; STANGER, R.L.; MILLMAN N. Ataractic suppression of isolation-induced aggressive behavior. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, v.123, p.179-185, 1959.
- ZANGROSSI, JR. H; GRAEFF, F. G. Modelos animais. In: HETEM, L.A.B; GRAEFF, F. G. (Ed.). *Transtornos de ansiedade*. Sao Paulo: Atheneu, 2004, p.55-73.
- ZELENA, D.; HALLER, J.; HALÁSZ, J.; MAKARA, G.B. Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. *Brain Res. Bull.*, v.48, n.3, p.297-302, 1999.
- ZYGMUNT, P.M.; PETERSSON, J.; ANDERSSON, D.A.; CHUANG, H.H.; SORGARD, M.; DI MARZO, V. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* v.400, n.6743, p.452–457, 1999.



Blockade of Cannabinoid CB1 Receptors in the Dorsal Periaqueductal Gray Unmasks the Antinociceptive Effect of Local Injections of Anandamide in Mice

Diego C. Mascarenhas^{1,2*}, Karina S. Gomes², Tatiani Sorregotti^{1,2} and Ricardo L. Nunes-de-Souza^{1,2}

¹ Joint Graduate Program in Physiological Sciences, Federal University of São Carlos and São Paulo State University, São Carlos, Brazil, ² Laboratory of Neuropsychopharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Francisco Ciruela,
University of Barcelona, Spain

Reviewed by:

Li Zhang,
National Institutes of Health (NIH),
United States

Vincenzo Di Marzo,
Consiglio Nazionale delle Ricerche
(CNR), Italy

*Correspondence:

Diego C. Mascarenhas
mascarenhasdc@gmail.com;
digo_mascarenhas@yahoo.com.br

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 22 July 2017

Accepted: 19 September 2017

Published: 04 October 2017

Citation:

Mascarenhas DC, Gomes KS,
Sorregotti T and Nunes-de-Souza RL
(2017) Blockade of Cannabinoid CB1
Receptors in the Dorsal
Periaqueductal Gray Unmasks
the Antinociceptive Effect of Local
Injections of Anandamide in Mice.
Front. Pharmacol. 8:695.
doi: 10.3389/fphar.2017.00695

Divergent results in pain management account for the growing number of studies aiming at elucidating the pharmacology of the endocannabinoid/endovanilloid anandamide (AEA) within several pain-related brain structures. For instance, the stimulation of both Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1) and Cannabinoid type 1 (CB1) receptors led to paradoxical effects on nociception. Here, we attempted to propose a clear and reproducible methodology to achieve the antinociceptive effect of exogenous AEA within the dorsal periaqueductal gray (dPAG) of mice exposed to the tail-flick test. Accordingly, male Swiss mice received intra-dPAG injection of AEA (CB1/TRPV1 agonist), capsaicin (TRPV1 agonist), WIN (CB1 agonist), AM251 (CB1 antagonist), and 6-iodonordihydrocapsaicin (6-iodo) (TRPV1 selective antagonist) and their nociceptive response was assessed with the tail-flick test. In order to assess AEA effects on nociception specifically at vanilloid or cannabinoid (CB) substrates into the dPAG, mice underwent an intrinsically inactive dose of AM251 or 6-iodo followed by local AEA injections and were subjected to the same test. While intra-dPAG AEA did not change acute pain, local injections of capsaicin or WIN induced a marked TRPV1- and CB1-dependent antinociceptive effect, respectively. Regarding the role of AEA specifically at CB/vanilloid substrates, while the blockade of TRPV1 did not change the lack of effects of intra-dPAG AEA on nociception, local pre-treatment of AM251, a CB1 antagonist, led to a clear AEA-induced antinociception. It seems that the exogenous AEA-induced antinociception is unmasked when it selectively binds to vanilloid substrates, which might be useful to address acute pain in basic and perhaps clinical trials.

Keywords: vanilloid substrates, cannabinoid substrates, anandamide, periaqueductal gray, antinociception

INTRODUCTION

Pain-related diseases have been extensively investigated in order to unmask its complex neurobiology and underlying mechanisms, and/or to provide novel treatment options. In this context, several neurotransmitters have been implicated mediating nociception, for instance, opioids (Yaksh and Noueihed, 1985; Jensen and Yaksh, 1989; Cornelio and Nunes-de-Souza, 2009;

Morgan et al., 2014), glutamate (Yaksh and Noueihed, 1985; Palazzo et al., 2013; Wilson-Poe et al., 2013), serotonin (Eschalié et al., 1989; Baptista-de-Souza et al., 2014; de Freitas et al., 2014), and endocannabinoids (Meng et al., 1998; Suplita et al., 2005; Olango et al., 2012). More recently, vanilloid compounds, which are known to activate the Transient Receptor Potential Vanilloid – type 1 (TRPV1) channels, emerged as an important neurotransmission system modulating nociception (e.g., McGaraughty et al., 2003; Starowicz et al., 2007; Mascarenhas et al., 2015).

The TRPV1 channels were found to be expressed in primary afferent neurons and implicated in transmitting noxious stimuli to the spinal cord [for a review, see Salat et al. (2013)]. Besides their role in pain modulation on peripheral nervous system (Gewehr et al., 2011), TRPV1 are also found in brainstem areas including the periaqueductal gray matter (PAG) (Cristino et al., 2006). This midbrain structure is highly involved in the modulation of defensive reactions such as fear/anxiety states as well as nociception (e.g., Starowicz et al., 2007; Lisboa and Guimaraes, 2012; Mascarenhas et al., 2013, 2015).

The midbrain PAG is part of the descending inhibitory system responsible for inhibiting pain processing at spinal cord level [for a review see Millan (2002)]. The PAG sends monosynaptically projections to the rostral ventromedial medulla (RVM) modulating *ON*- and *OFF*-cells that when activated are responsible, respectively, for facilitating and inhibiting pain at spinal cord level (Palazzo et al., 2008). This PAG–RVM circuitry expresses several neurotransmitters systems, e.g., glutamate (Palazzo et al., 2013), cannabinoid (CB; Hohmann et al., 2005), opioid (Wang and Wessendorf, 2002), vanilloid (Maione et al., 2006; Palazzo et al., 2008), and is known to be a pivotal supraspinal circuitry involved in the central modulation of pain (Jensen and Yaksh, 1989; Heinricher et al., 2009).

Several authors have investigated particularly the role of CBs and vanilloids in this circuitry modulating nociception. For instance, the stimulation of Cannabinoid receptor type 1 (CB1), expressed in both glutamatergic and GABAergic neurons in the PAG, leads to inhibition or excitation, respectively, of the pain modulating circuitry located in the RVM (Vaughan et al., 2000; Maione et al., 2006; Palazzo et al., 2008). Therefore, CB1-mediated nociception is under a complex modulation and paradoxical effects have been reported (Meng et al., 1998; Meng and Johansen, 2004; Maione et al., 2006). In addition, TRPV1 stimulation causes glutamate release within the RVM which in turn activates the descending inhibitory system, leading to antinociception (Palazzo et al., 2002; Starowicz et al., 2007; Mascarenhas et al., 2015). However, contrasting effects, i.e., hypernociception, have also been reported following TRPV1 stimulation, an action attributed to the capacity of TRPV1 desensitization (McGaraughty et al., 2003).

The investigation of the descending inhibitory system gained a novel impulse when vanilloid substrates showed to be closely related to the CB substrates. In this context, the two major endocannabinoids, *N*-arachidonoyl ethanolamine (anandamide; AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), have been implicated in the modulation of pain (Olango et al., 2012) and the former compound is known to bind to both CB1 and TRPV1 channels

(Zygmunt et al., 1999; Ross et al., 2001; Maione et al., 2006). Additionally, Maione et al. (2006) showed that the inhibition of AEA degrading fatty acid amide hydrolase (FAAH) enzyme in the ventrolateral PAG (vlPAG) provoked either antinociception or pronociception via TRPV1 or CB1 activation, respectively, in rats subjected to the plantar test. However, it remains to be determined whether exogenous AEA injected into the PAG plays a role in the modulation of acute pain.

Since CB and vanilloid substrates lead to paradoxical effects on nociception due to physiological (different neurons population expressing CB1 receptors) and pharmacological (desensitization phenomenon) properties of each system, respectively, we hypothesized whether exogenous AEA might lead to a more clear and reproducible effect on nociception according to the substrates recruited within the mouse dorsal periaqueductal gray (dPAG). Thus, this study sought to demonstrate the role of exogenous AEA acting specifically either at TRPV1 or CB1 receptors located within the dPAG in the modulation of the nociceptive response. To that end, firstly we investigated the effects of intra-dPAG injections of AEA, capsaicin (a TRPV1 agonist), WIN 55,212-2 (a CB1 agonist), AM251 (a CB1 receptor antagonist), or 6-iodonordihydrocapsaicin (6-IODO) (a TRPV1 antagonist) on acute nociceptive response assessed through the tail-flick test (Experiments 1A–E). Then, the effects of intra-dPAG AEA on nociception were investigated under local blockade of CB1 (Exp. 2) or TRPV1 (Exp. 3) receptors.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Subjects were 181 male Swiss adult mice (UNESP – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil), weighing 28–35 g at testing. They were housed in groups of 10 per cage (41 cm × 34 cm × 16 cm) and maintained under a normal 12 h light cycle (lights on 07:00 h) in a temperature controlled environment (23 ± 1°C). Food and water were freely available except during the brief test periods. All mice were naïve at the beginning of experiments and each mouse was used once. All efforts were made to minimize animal suffering.

Drugs

The drugs were capsaicin (0.01, 0.1, or 1 nmol), a TRPV1 agonist, 6-IODO (1 or 3 nmol), a TRPV1 antagonist and (*R*)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-*de*]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate (WIN – 1, 10, or 50 nmol), a CB1 agonist, dissolved in undiluted dimethylsulfoxide (DMSO) due to solubility issues. Given that lipids in Tocrisolve™ (a formulation composed of a 1:4 ratio of soya oil/water which is emulsified with the block co-polymer, Pluronic F68) can be conveniently diluted with any aqueous medium for further use, AEA (CB1/TRPV1 agonist) which is already sold in Tocrisolve™ (AEA; 0.5, 5.0, or 50 pmol) was diluted in saline solution (NaCl 0.9%). Lastly *N*-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251 – 1 or 10 pmol), a CB1 antagonist, was dissolved in DMSO 20% in saline (0.9%

NaCl). Undiluted DMSO, saline, and DMSO 20% were used as vehicles for their respective groups. An additional group treated with Tocrisolve™ was used for a comparison with other vehicle groups. Capsaicin, AEA, Tocrisolve™, 6-IODO, and WIN were purchased from Tocris Cookson, Ballwin, MO, United States and AM251 from Sigma-Aldrich. The doses were based in pilot and previous studies (Maione et al., 2006; Moreira et al., 2007; Mascarenhas et al., 2013, 2015; Batista et al., 2015). The mass weight of each drug necessary for samples of 25 μ L in the doses described were as follow: 50 nmol AEA = 2.12 mg; 10 nmol capsaicin = 3.75 mg; 50 nmol WIN = 3.25 mg; 10 nmol AM251 = 6.94 mg; and 3 nmol 6-IODO = 1.57 mg. Evidently, all drugs had to be diluted from this first solution to reach the proper doses. The final microinjection volume necessary to deliver the referred doses into the dPAG was 0.2 μ L.

Surgery and Microinjection

Mice received a Stereotaxic (Kopf Instruments) unilateral implant of a 7 mm stainless steel guide cannula (26-gauge; Insight Equipamentos Científicos Ltda.) targeted to the dPAG under ketamine + xylazine anesthesia (100 and 10 mg/kg, i.p.). The guide cannula was fixed to the skull using dental acrylic and jeweler's screws. Stereotaxic coordinates (Paxinos and Franklin, 2004) for the dPAG (dorsolateral and dorsomedial columns) were 4.1 mm posterior to bregma, 1.4 mm lateral to the midline, and 2.3 mm ventral to the skull surface, with the guide cannula angled 26° to the vertical. A dummy cannula (33-gauge stainless steel wire; Fishtex Industry and Commerce of plastics Ltd.), inserted into each guide-cannula immediately after surgery, served to reduce the incidence of occlusion. At the end of the stereotaxic surgery, each mouse received an intramuscular injection of penicillin-G benzathine (Pentabiotic, 56.7 mg/kg in a 0.1 mL volume; Fort Dodge, Campinas, São Paulo, Brazil) and a subcutaneous injection of the anti-inflammatory analgesic Banamine (3.5 mg/kg flunixin meglumine, Intervet Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, in a volume of 0.3 mL).

Five to seven days after surgical recovery and clearance of post-operative anti-inflammatory drugs, solutions were injected into the dPAG, blind to treatment, by microinjection units (33-gauge stainless steel cannula; Insight Equipamentos Científicos Ltda.), which extended 1.0 mm beyond the tips of the guide cannula. Each microinjection unit was attached to a 2 μ L Hamilton microsyringe via polyethylene (PE-10) tubing, and administration was controlled by the experimenter at a rate of 0.2 μ L (volume injected) over a period of approximately 20 s. The microinjection procedure consisted of gently restraining the animal, removing off the dummy cannula, inserting the injection unit, infusing the solution, and keeping the injection unit *in situ* for further 60 s. Confirmation of successful infusion was obtained by monitoring the movement of a small air bubble in the PE-10 tubing.

Apparatus; Tail-Flick Test

Nociception was assessed using the tail-flick test as previously described (Siegfried et al., 1987). To measure tail-flick latency (TFL), each mouse was gently restrained and the light source was focused on the distal portion of the mouse tail. A deflection of

the tail activated a photocell mounted above it and terminated test. The light intensity was adjusted to 45 μ A to obtain baselines from 2.0 to 3.0 s. Selection of the light intensity was based on pilot studies and it was kept constant throughout the Experiments. A cut-off time of 6 s was used in nonreactive animals. Tail-flick latencies were recorded 0 and 10 min before and 10, 15, 20, 30, and 40 min after pharmacological treatment into mice dPAG. In Exp. 1C at 50 min it was necessary an additional TFL recording due to a delay WIN-induced antinociception. In Experiments 2 and 3, pretreatment and treatment occurred within a time interval of 10 min (Figure 1). A pilot study was carried out aiming at revealing whether seven (or eight in the case of Exp. 1C) TFL records were able to induce tissue damage and no apparent effect was observed up to 24 h later the last measure. Each TFL was normalized by calculating an analgesia index (AI):

$$AI = \frac{(\text{test TFL}) - (\text{average baseline TFL})}{6 - (\text{average baseline TFL})},$$

where AI = analgesia index; test TFL = latency of tail withdrawal scored 10, 15, 20, 30, and 40 (50 min in Exp. 1C) min after pharmacological treatment; average baseline TFL = average of the basal latencies of tail withdrawal 10 and 0 min before pharmacological treatment; 6 = cut-off time in seconds.

Procedures

All healthy animals were transported to the experimental room and left undisturbed for at least 1 h for habituation before Experiments commence.

Experiments 1A–E: Intra-dPAG Injections of AEA, Capsaicin, WIN, AM251, or 6-IODO on Nociception in Mice

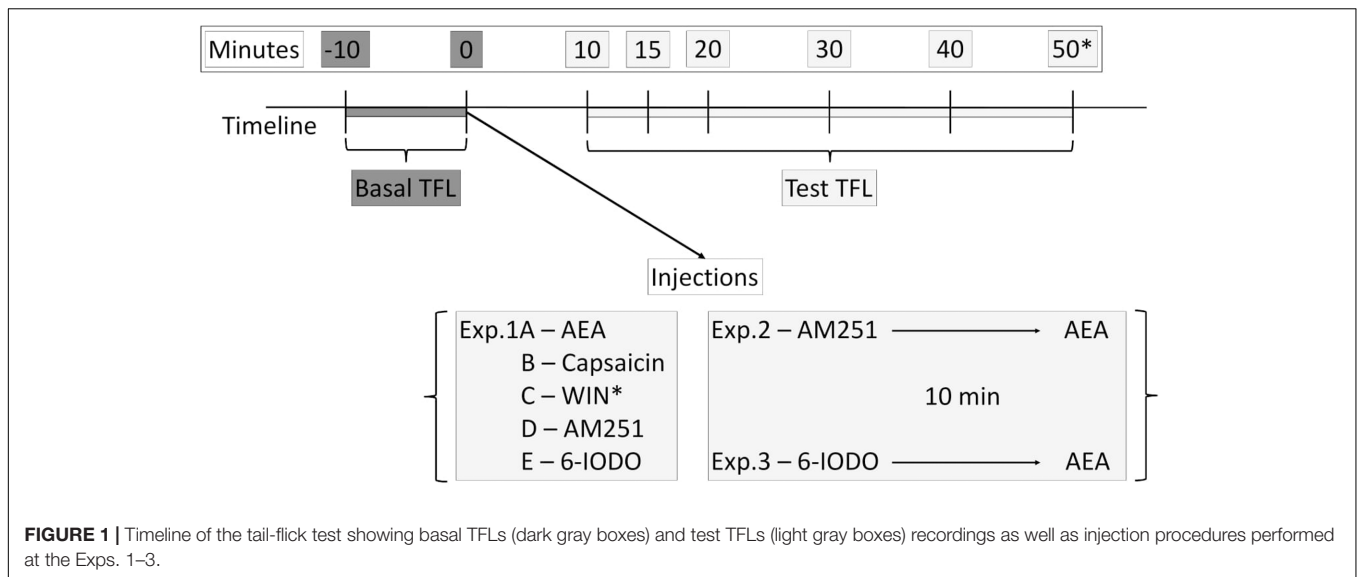
On test day, mice had two baseline TFLs recorded, at an interval of 10 min, and subsequently underwent intra-dPAG injections of AEA (vehicle, 0.5, 5.0, or 50 pmol; Exp. 1A), capsaicin (vehicle, 0.01, 0.1, or 1 nmol; Exp. 1B), WIN (vehicle, 1, 10, or 50 nmol; Exp. 1C), AM251 (vehicle, 1 or 10 pmol; Exp. 1D), or 6-IODO (vehicle, 1 or 3 nmol; Exp. 1E). Further TFLs were carried out at 10, 15, 20, 30, and 40 min after intra-dPAG microinjection of the solutions. In Exp. 1C, a further TFL record at 50 min post-treatment was also performed.

Experiments 2 and 3: Assessment of Intra-dPAG AEA Effects under Local Blockade of CB1 or TRPV1 Receptors in Mice Nociception

Aiming at revealing AEA effects specifically at vanilloid or CB substrates, mice had two baseline TFLs recorded, as described for Exps. 1A–E, following intra-dPAG administration of AM251 (10 pmol; Exp. 2) or 6-IODO (1 pmol, Exp. 3) at intrinsically inactive doses on nociception. Ten minutes later, they received local injections of AEA (vehicle, 0.5, 5.0, or 50 pmol). Animals were then subjected to the tail-flick test at 10, 15, 20, 30, and 40 min after the second microinjection.

Histology

At the end of testing, all animals received an intra-dPAG 0.2 μ L infusion of 1% Evans blue, according to the microinjection



procedure described in the Section “Surgery and Microinjection.” The animals were then sacrificed in a CO₂ chamber, their brains removed and injection sites histologically verified through coronal sections performed with a cryostat (Leica CM 1850) and a microscope (Leica DMLB) according to the atlas of Paxinos and Franklin (2004).

Data Analysis

Data were subjected to Levene’s test of homogeneity followed by two-way analysis of variance [ANOVA; factor 1: treatment; factor 2: time (repeated measures)]. When appropriate data were subjected to the Duncan’s Multiple Comparisons Test. A value of $P \leq 0.05$ was set for significance.

Ethics Statement

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Brazilian Society of Science of Laboratory Animals (SBCAL), which complies with international guidelines for animal use and welfare. The protocol was approved by the local Research Ethics Committee (CEP/FCF/Car, Universidade Estadual Paulista, resolution 16/2013).

RESULTS

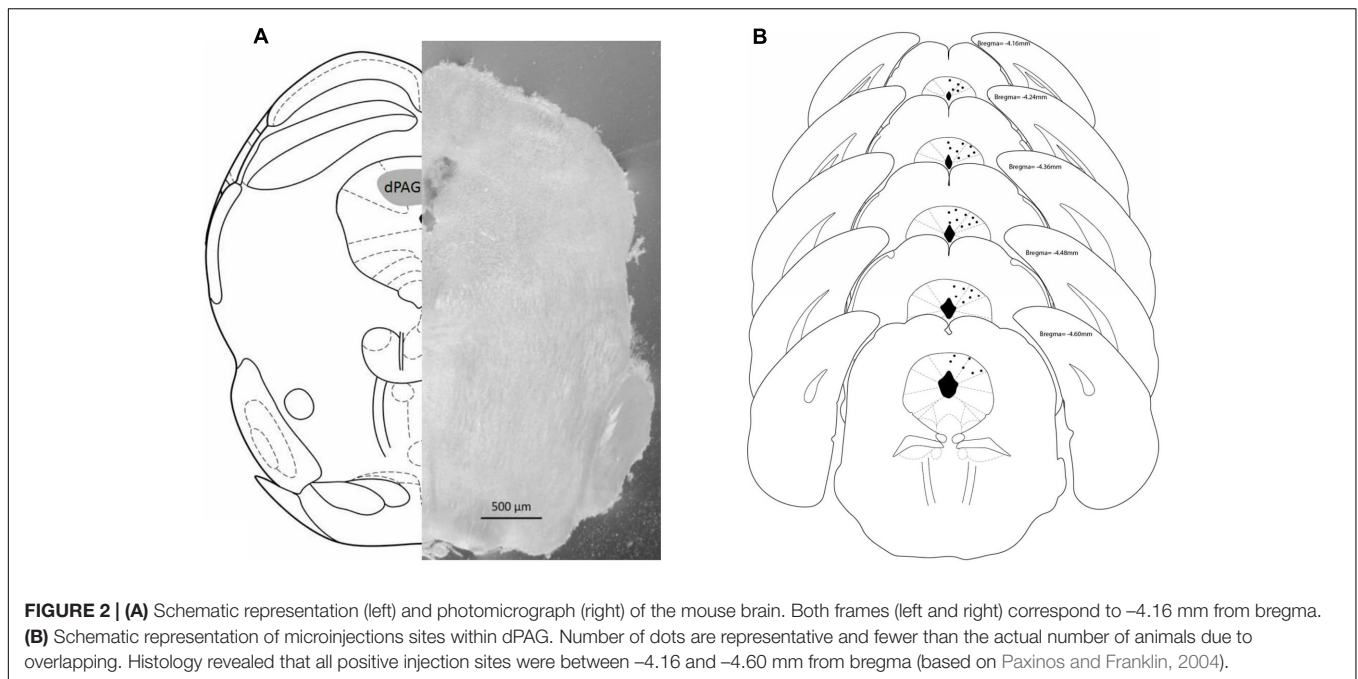
Firstly, given the different vehicles used to dissolve the drugs tested throughout the study, a comparison of the TFL of vehicle-treated mice was performed in order to exclude/detect any vehicle-mediated effects on nociception. The procedure was similar to that performed on Exps. 1A–E. Vehicle groups were saline (Exp. 1A), undiluted DMSO (Exps. 1B,C,E), and DMSO 20% in saline (Exp. 1D). Moreover, a TocrisolveTM-treated group ($n = 7$) of animals within the dPAG was also included in this analysis since AEA, a lipid compound, must be dissolved in this formulation which allows a conveniently dilution in any

aqueous medium. Importantly, two-way ANOVA did not reveal significance for any factor (all F -values ≤ 0.82 ; $P > 0.05$) (data not shown).

Histology

Figure 2A shows a schematic representation of a coronal section of the mouse brain (left) based on the atlas of Paxinos and Franklin (2004) highlighting the dorsal PAG (gray area) mirrored to a coronal photomicrograph (right) of a representative subject with a microinfusion site within the dPAG. **Figure 2B** also shows a schematic representation of brain sections indicating the microinfusion sites within the midbrain dPAG.

Histology confirmed that 141 mice had accurate cannula placements in the dPAG. Eighteen animals were used to investigate the effects of intra-dPAG AEA microinjection [Experiment 1A: vehicle ($n = 5$); AEA 0.5 pmol ($n = 4$); AEA 5.0 pmol ($n = 4$); AEA 50.0 pmol ($n = 5$)]. Twenty-two animals were used to assess the effects of capsaicin microinjections into the dPAG [Experiment 1B: vehicle ($n = 6$); cpsa 0.01 nmol ($n = 5$); cpsa 0.1 nmol ($n = 6$); cpsa 1 nmol ($n = 5$)]. Twenty-four animals were necessary to reveal the effects of intra-dPAG injections of WIN [Experiment 1C: vehicle ($n = 7$); WIN 1 nmol ($n = 5$); WIN 10 nmol ($n = 6$); WIN 50 nmol ($n = 6$)]; 13 animals were used in Experiment 1D [vehicle ($n = 5$); AM251 1 pmol ($n = 4$); AM251 10 pmol ($n = 4$)]. In Experiment 1E, 15 animals were necessary to reveal the intra-dPAG TRPV1 antagonism profile [vehicle ($n = 4$); 6-IODO 1 nmol ($n = 6$); 6-IODO 3 nmol ($n = 5$)]. Twenty-two animals were required to reveal the effects of AEA acting specifically on vanilloid substrates [Experiment 2: AM251–vehicle ($n = 4$); AM251–AEA 0.5 pmol ($n = 6$); AM251–AEA 5.0 pmol ($n = 5$); AM251–AEA 50 pmol ($n = 7$)]. Finally, 20 animals were used to reveal the opposite, i.e., AEA acting specifically on CB substrates [Experiment 3: 6-IODO–vehicle ($n = 5$); 6-IODO–AEA 0.5 pmol ($n = 4$); 6-IODO–AEA 5.0 pmol ($n = 5$); 6-IODO–AEA 50 pmol ($n = 6$)].



Additionally, seven mice that received a Trocisolve™ injection into the dPAG were included in a separated group to be compared to the other vehicle-treated mice (see vehicle groups above).

Forty animals were excluded from the study. Eight of them had their baseline TFLs reached the cut-off time (i.e., 6 s), 29 were off-targets and 3 were outliers according to extreme studentized deviate (ESD) test.

Experiment 1A: Lack of Effect of Intra-dPAG AEA on Nociception

Figure 3A reveals the lack of effect of intra-dPAG AEA injections (0, 0.5, 5.0, or 50 pmol) on the TFL of mice recorded until 40 min post-injection. Two-way ANOVA did not reveal significance for any factor (all F -values ≤ 0.46 ; $P > 0.05$).

Experiment 1B: Antinociceptive Effect of Intra-dPAG Capsaicin

Figure 3B shows the effects of intra-dPAG capsaicin microinjections (0, 0.01, 0.1, or 1 nmol) on the TFL of mice. Two-way ANOVA pointed out significance for treatment factor [$F(3,18) = 36.60$; $P < 0.05$], time factor [$F(6,108) = 24.75$; $P < 0.05$], and treatment \times time interaction [$F(18,108) = 13.78$; $P < 0.05$]. Duncan's test confirmed a dose-dependent antinociceptive effect of capsaicin (0.1 and 1 nmol) compared to vehicle-treated animals ($P < 0.05$). Animals presented a high magnitude antinociception when treated with capsaicin 1 nmol which lasted for 20 min. The intermediate dose (0.1 nmol) provoked a less intense, however, long lasting antinociceptive effect (up to 30 min) which was significantly lower than the higher dose until 20 min after treatment ($P < 0.05$). At the end

of testing (40 min after treatment), animals no longer showed antinociception ($P > 0.05$).

Experiment 1C: Antinociceptive Effect of Intra-dPAG WIN 55,212-2

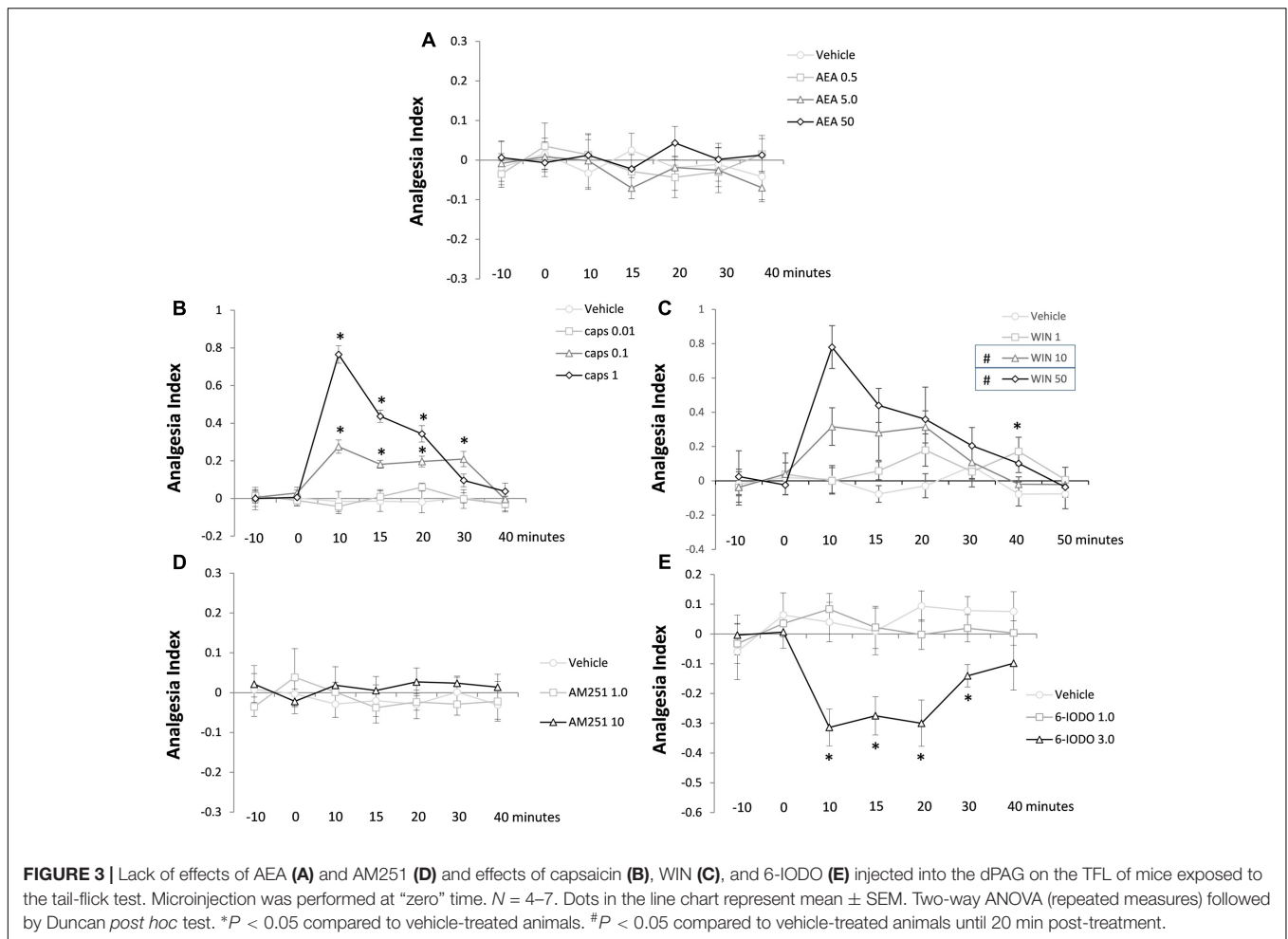
Analyzing Figure 3C is possible to interpret the effects of intra-dPAG of WIN 55,212-2 (vehicle, 1, 10, or 50 nmol) on the TFL in mice. Two-way ANOVA showed significant effect of treatment [$F(3,20) = 12.62$; $P < 0.05$] and time [$F(7,140) = 5.61$; $P < 0.05$] factors as well as treatment \times time interaction [$F(21,140) = 2.34$; $P < 0.05$]. *Post hoc* analysis confirmed a 20-min lasting antinociception on both 10 and 50 nmol-treated groups compared to vehicle-treated animals ($P < 0.05$). Sound with a dose-dependent effect the higher dose (50 nmol) of WIN provoked a more accentuated antinociceptive effect compared to the mild dose (10 nmol) at 10-min post-treatment ($P < 0.05$). The lower dose (1 nmol) of WIN caused a delayed antinociceptive effect at 40 min post-treatment compared to vehicle-treated animals ($P < 0.05$). At 50 min, animals no longer presented antinociception ($P > 0.05$).

Experiment 1D: Lack of Effect of Intra-dPAG AM251 on Nociception

Figure 3D summarizes the lack of effects of intra-dPAG injections of AM251 (0, 1, or 10 pmol) on the TFL in mice. Two-way ANOVA did not reveal significance for any of the three factors (all F -values ≤ 0.83 ; $P > 0.05$).

Experiment 1E: Hypernociceptive Effect of Intra-dPAG 6-IODO

Figure 3E reveals the effects of intra-dPAG 6-IODO (0, 1, or 3 nmol) on the TFL in mice. Two-way ANOVA pointed



out significance effects for treatment factor [$F(2,12) = 18.66$; $P < 0.05$] and treatment \times time interaction [$F(12,72) = 2.34$; $P < 0.05$] without revealing significance for time factor [$F(6,72) = 1.32$; $P > 0.05$]. Duncan's *post hoc* test confirmed a 30-min lasting hypernociception in 6-IODO-treated animals (3 nmol) compared to vehicle group. At 40 min after treatment, all animals had their TFL reached the baseline threshold ($P < 0.05$).

Experiment 2: Antinociceptive Effect of Intra-dPAG AEA under Blockade of Local CB1 Receptors

Figure 4 shows the effect of intra-dPAG AEA (0, 0.5, 5.0, or 50 pmol) on nociceptive response of mice previously treated with AM251 (10 pmol, an intrinsically inactive dose; see Exp. 1C) into the same site. Two-way ANOVA revealed significant effects for all factors including their interaction; {treatment [$F(3,18) = 77.91$; $P < 0.05$]; time [$F(6,108) = 20.06$; $P < 0.05$]; treatment \times time interaction [$F(18,108) = 13.80$; $P < 0.05$]}]. Duncan's multiple comparison test confirmed a dose-dependent antinociceptive effect of AEA (5.0 and 50 pmol) compared to vehicle-treated group. Similarly to the effects provoked by Capsaicin (Exp. 1B),

50 pmol AEA increased the AI of animals up to 20 min. However, at the dose of 5.0 pmol, AEA produced only a mild antinociceptive effect observed at 15 min followed intra-dPAG injection. Yet, none dose of AEA changed nociceptive response at 30 and 40 min after drug injection ($P > 0.05$).

Experiment 3: Lack of Effect of Intra-dPAG AEA under Blockade of Local TRPV1 Receptors

The last Experiment is summarized in Figure 5 which shows lack of effects of intra-dPAG treatment of AEA (0, 0.5, 5.0, or 50 pmol) in animals previously treated with 6-IODO (1 nmol, an intrinsically inactive dose; see Exp. 1D) into the same site. Two-way ANOVA showed significant effects only for time factor [$F(6,96) = 2.4$; $P < 0.05$]. Duncan's *post hoc* test confirmed a difference in the AI of the basal TFLs (-10 and 0 min) as well as in the -10 min TFL compared to 10 min TFL ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The main results of this study point out that AEA (0.5–50 pmol), a TRPV1/CB1 agonist, injected into the mouse dPAG does not

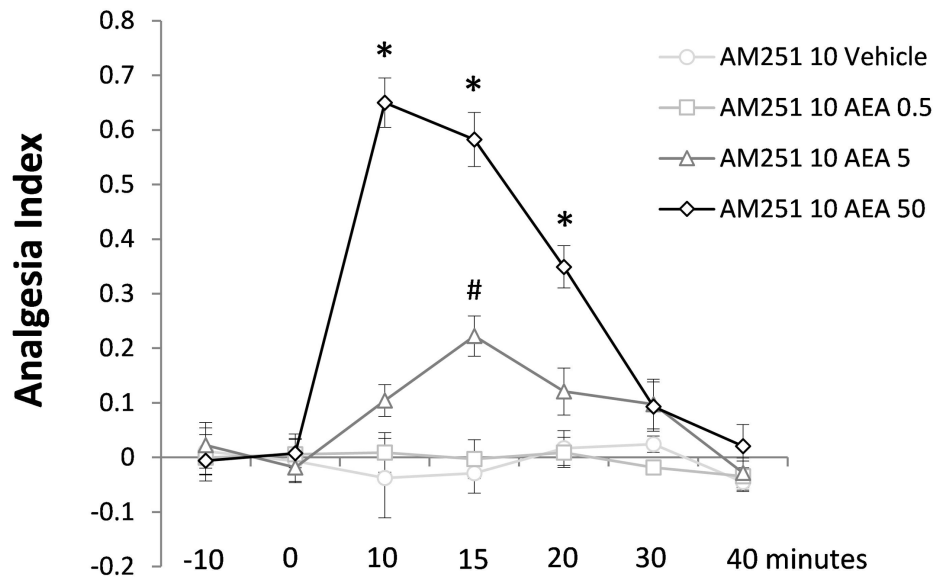


FIGURE 4 | Antinociceptive effects of intra-dPAG AM251 microinjection followed by local AEA on the TFL of mice exposed to the tail-flick test. Microinjections were performed at “zero” time. $N = 4-7$. Dots in the line chart represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared to vehicle-treated animals. Two-way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test.

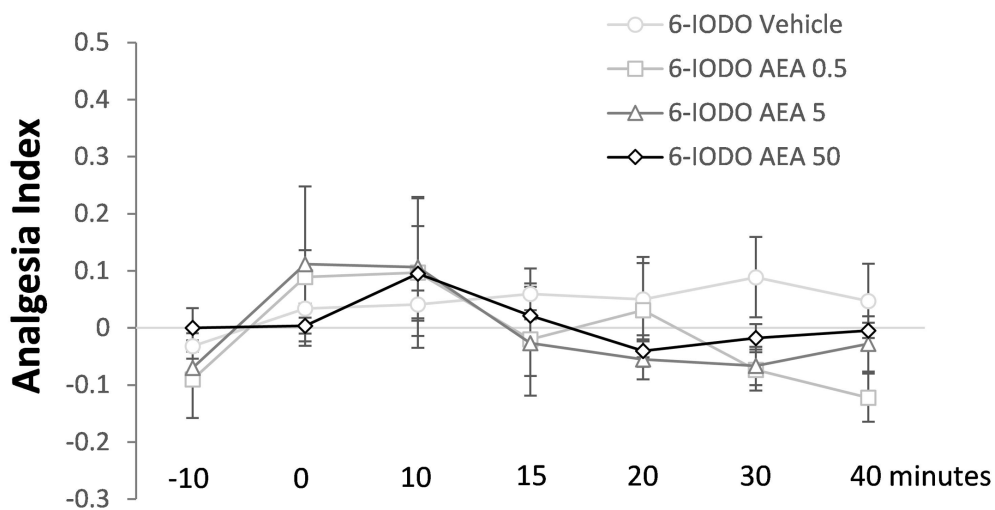


FIGURE 5 | Lack of effects of intra-dPAG 6-iodo microinjection followed by local AEA on the TFL of mice exposed to the tail-flick test. Microinjections were performed at “zero” time. $N = 4-6$. Dots in the line chart represent mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test.

produce any intrinsic effect on acute pain as assessed through the tail-flick test (Exp. 1A). Conversely, intra-dPAG injections of capsaicin (0.1 and 1 nmol – Exp. 1B) or WIN (10 and 50 nmol – Exp. 1C) provoked a marked TRPV1- and CB1-dependent antinociception, respectively. While the blockade *per se* of CB1 receptors did not change nociceptive response (Exp. 1D), intra-dPAG injection of 6-iodo, a TRPV1 antagonist, produced a hypernociceptive effect (Exp. 1E). Interestingly, under blockade of CB1 receptors, intra-dPAG AEA produced a clear and consistent antinociceptive effect (Exp. 2). In contrast, the blockade of TRPV1 did not change the lack of

effects of intra-dPAG injection of AEA on nociceptive response (Exp. 3).

Intra-dPAG injections of AEA (0.5–50 pmol), an endocannabinoid/endovanilloid agonist (Zygmunt et al., 1999; Van Der Stelt and Di Marzo, 2004; Marinelli et al., 2007), failed to alter TFL throughout the 40-min test. This unexpected result contrasts with previous findings showing that intra-vlPAG injections of mild doses of URB597 (an FAAH enzyme inhibitor), which in turn increases endogenous AEA, led to a vanilloid-mediated analgesia in rats exposed to the plantar test (Maione et al., 2006). However, those authors also

reported that local low or high doses of the FAAH inhibitor provoked CB-mediated hyperalgesia (Maione et al., 2006). Based on present study, AEA acting specifically on CB substrates (Exp. 3) corroborated the lack of effect of AEA (Exp. 1A) suggesting that the doses of this vanilloid/CB agonist used in Exp. 1A might also have stimulated preferentially CB1 receptors. Indeed, the role of CB substrates on nociception is under a complex debate. A less likely possibility might account for this lack of effect considering a combined stimulation of TRPV1/CB1 receptors in Exp. 1, since it has been demonstrated a net null effect following both vanilloid/CB activation on the ventrolateral column of the PAG (Maione et al., 2006). In this regard, since previous results from our laboratory showed a vanilloid-mediated antinociception into the dorsal PAG (Mascarenhas et al., 2015), present study was conducted accordingly in the same midbrain column in an attempt to be consistent with previous findings. These site differences (dorsal versus ventrolateral columns) could also explain such discrepancies.

To clarify the involvement of dPAG TRPV1 and CB1 receptors in the modulation of the nociceptive response this study investigated the effects of specific vanilloid or CB agonists into the mouse dPAG on nociception. Interestingly, both capsaicin (0.1 and 1 nmol) and WIN (10 and 50 nmol) injected into the mouse dPAG increased dose-dependently the TFL of mice, suggesting a vanilloid- and a CB-dependent antinociception, respectively. Present study also reported a delayed CB-mediated antinociception following a local injection of a low dose (1 nmol) of WIN. In general, these results corroborate many other studies showing that capsaicin injected into various PAG columns provokes antinociception in rodents (Palazzo et al., 2002; Starowicz et al., 2007; Mascarenhas et al., 2015) possibly by facilitating the descending inhibitory system. Regarding CB1 role in the modulation of nociception, as presently shown with intra-dPAG injections of WIN, a great body of evidence have shown that phytocannabinoids (Lichtman and Martin, 1996; Meng et al., 1998), synthetic agonists (Meng et al., 1998), and endocannabinoids (Maione et al., 2006) induce antinociception as assessed through acute pain tests. However, contrasting results have also been reported with TRPV1 and CB1 manipulations. For instance, the hypernociception reported following vanilloid stimulation (McGaraughty et al., 2003) is an effect that has been attributed to the capacity of desensitization of TRPV1 receptors (Palazzo et al., 2008). In this later scenario, i.e., vanilloid-induced hypernociception, only high doses of TRPV1 agonist would be sufficient to induce desensitization (Palazzo et al., 2008). Regarding the hypernociceptive effects following CB1 receptor activation, previous studies have demonstrated immediate and delayed hypernociceptive effects when low doses of WIN or URB597 were injected into the rat vPAG (Maione et al., 2006). This paradoxical profile of CB1 agonists seems to be due to the expression of CB1 receptors on both glutamatergic and GABAergic neurons at pain modulating circuitry of these murine species (Palazzo et al., 2008).

Accordingly, Exps. 1D and E were carried out in order to find intrinsically inactive doses of CB1 and TRPV1 antagonists

on nociception when injected into the mouse dPAG. Exp. 1D revealed that AM251, a CB1 receptor antagonist, did not change nociceptive response of mice subjected to the tail-flick test, indicating lack of CB tonic control over dPAG CB1 receptors in the modulation of acute pain. This is in accordance to the fact that the CB system is recruited only on demand [for a review see Morena and Campolongo (2014) and Ulugol (2014)]. On the contrary, Exp. 1E showed that intra-dPAG 6-IODO (TRPV1 antagonist) at the highest dose (3 nmol) decreased the TFL, suggesting a hypernociceptive effect and therefore an endovanilloid tonus within the mouse dPAG modulating nociception. Starowicz et al. (2007) have first demonstrated a tonic endovanilloid facilitation of glutamate release within rats PAG, since 5'-iodoresiniferatoxin, a selective TRPV1 antagonist, facilitated nociceptive responses. In addition, authors have demonstrated that endovanilloids contribute to anxiety modulation. In this context, capsazepine (TRPV1 antagonist) injected into the PAG attenuated the defensive behavior of rats exposed to the elevated plus maze (Moreira et al., 2007).

The well-known CB1-mediated antinociception found in Exp. 1C seems to be due to the inhibition of GABA release from PAG interneurons, which in turn would contribute to disinhibition of PAG antinociceptive outputs (Moreau and Fields, 1986; Meng et al., 1998; Vaughan et al., 2000). It contrasts with the lack of effect of AEA acting specifically on CB substrates reported on Exps. 1A and 3. In this context, although no Experiment has assessed the said issue, it is likely that the doses of AEA stimulated both neurons population-expressing CB1 receptors and nociception might have been physiologically counterbalanced which accounts for the lack of effect. In addition, WIN displays different pharmacodynamics aspects (higher CB1 affinity therefore lower K_i value) and it is not subjected to FAAH hydrolyses compared to AEA, which makes difficult the comparison of doses of a synthetic versus endogenous CB1 agonist. Furthermore, it is still necessary considerably more investigation to unravel the participation of glutamatergic and GABAergic neurons-expressing CB1 receptors since, physiologically, CB-mediated outcomes are under opposite pathways.

Attempting to determine the role of exogenous AEA binding preferentially at either TRPV1 or CB1 receptors, Exps. 2 and 3 consisted on evaluating nociceptive response in mice that had received intra-dPAG injection of AM251 (10 pmol) or 6-IODO (1 nmol) prior to local injections of AEA. Interestingly, contrasting with the results obtained in Exp. 1A, AEA (5.0 and 50 pmol) produced a marked antinociceptive effect only under the blockade of CB1 receptors (Exp. 2). AEA, at the highest dose, provoked a high-magnitude 20-min lasting antinociceptive effect possibly via vanilloid substrates, corroborating Exp. 1B, which revealed a similar capsaicin-induced antinociception. On the contrary, the blockade of vanilloid substrates failed to reveal any intrinsic effect of intra-dPAG AEA on nociception (Exp. 3), corroborating the lack of effect observed in Exp. 1A, where only AEA was injected. Thus, it seems reasonable to suggest that the doses of AEA used in Exp. 1A have also preferentially stimulated the CB substrates even though no antagonism was performed. In this context, in terms of pharmacodynamics, AEA binds to CB1

receptors with higher affinity (K_i value between 37 and 116 nM) compared to TRPV1 receptor (K_i value 1.66 μ M) (Ross et al., 2001). Therefore, Experiment 1A seems to corroborate the higher affinity of AEA to CB substrates at a behavioral level since it revealed the same outcome of Exp. 3.

In this context, it has been shown that AEA might also act via other ligand-gated channels, such as the 5-HT₃ and glycine receptors, which potentially could contribute to AEA-induced effects on nociception. However, the AEA role on 5-HT₃ receptors highly depends on the abundance of this receptor at the cell surface of specific brain sites (Barann et al., 2002; Xiong et al., 2008). Furthermore, AEA seems to enhance glycine clearance in the synaptic cleft (Pearlman et al., 2003), which, physiologically, could impair the NMDA-dependent excitatory current and by extension AEA-induced antinociception which depends on glutamate release into RVM OFF cells. These evidence have weakened the concern with the potential influence of other channels in AEA effects together to the fact that several evidence point out the relevance of vanilloid/CB substrates in mediating AEA-induced effects (Zygmunt et al., 1999; Vaughan et al., 2000; Fenwick et al., 2017). In other words, these evidence strengthen the fact that Exps. 2 and 3 indeed led AEA to bind with specificity to vanilloid and CB substrates, respectively.

According to our hypothesis, AEA-induced antinociception seems to be easily reproduced when it is vectored to vanilloid substrates where only desensitization must be avoided. In other words, controlling the amount of endovanilloid that stimulates TRPV1 receptors, AEA will ultimately provoke antinociception. In contrast, aiming at studying CB1-mediated antinociception, one must take into account the complex neurophysiology of the CB substrates within the dPAG, where both glutamatergic and GABAergic neurons express CB1 receptors. In addition, it seems that while present results unmask exogenous AEA antinociceptive effects after CB1 blockade in the PAG, FAAH inhibitors unravel endogenous AEA effects intra-vlPAG that might be pro- or antinociceptive depending on the doses (Maione et al., 2006).

Noteworthy, in Exp.1 the dosage of AEA (0.5–50 pmol) was a bit disconnected to that used for capsaicin (0.01–1 nmol). On the one hand, it might weaken our study in view of their different affinities for TRPV1 (AEA displays lower affinity to TRPV1 than capsaicin) and therefore a higher dosage of AEA and a lower dosage of capsaicin than those employed in the present study should have been considered. However, on the other hand, it strengthens the fact that a very low dose of AEA was able to induce antinociception via TRPV1 under local CB1 blockade (Exp. 2), corroborating the hypothesis that depending on the

substrates (i.e., TRPV1 or CB1) AEA might provoke a clear and potent antinociceptive effect.

Finally, it is likely that a broader range of AEA doses on Exp. 3 would possibly reveal a different outcome of this compound acting preferentially on CB substrates, since the doses of AEA determine the proper CB1-mediated effects. However, analyzing the effects in Exp. 2, present data suggest an interesting approach to address exogenous AEA effects on nociception (i.e., vectoring AEA to act preferentially on vanilloid substrates) and eventually allowing promising clinical trials which until now does not seem to translate to humans the potential of CB compounds (e.g., AEA) in pain management.

As far as we know, present results are the first to demonstrate antinociceptive effects of exogenous AEA injected into the dPAG specifically in an acute pain test, i.e., tail-flick test. So far, only endogenous AEA has been investigated in the modulation of nociception. In conclusion, present study revealed an antinociceptive effect of exogenous AEA injected into the dPAG only when CB1 receptors were antagonized, suggesting an important role of AEA in the vanilloid substrates that modulate acute pain within this midbrain area of mice. Therefore, it makes relevant to investigate further approaches considering the role of AEA binding specifically in vanilloid substrates as a potential new methodology to address acute pain on basic research and perhaps clinical trials.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DM and RN-d-S designed the study. DM performed the acquisition, data analysis, and drafted the manuscript. DM, RN-d-S, KG and TS participated in interpretation of data and critically revised the manuscript for important intellectual content. DM, RN-d-S, KG and TS approved the manuscript in its final version.

FUNDING

This work was supported by the CNPq (proc. 478696/2013-2 and 306556/2015-4), FAPESP (proc. 2013/01283-6, 2013/06764-2, and 2013/03445-3), and PADC/FCF/Ar-UNESP.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Elisabete Zocal Paro Lepera and Rosana Finoti Pupim Silva for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- Baptista-de-Souza, D., Di Cesare Mannelli, L., Zanardelli, M., Micheli, L., Nunes-De-Souza, R. L., Canto-De-Souza, A., et al. (2014). Serotonergic modulation in neuropathy induced by oxaliplatin: effect on the 5HT_{2C} receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 735, 141–149. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.04.028
- Barann, M., Molderings, G., Bruss, M., Bonisch, H., Urban, B. W., and Gothert, M. (2002). Direct inhibition by cannabinoids of

human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br. J. Pharmacol.* 137, 589–596. doi: 10.1038/sj.bjp.0704829

- Batista, P. A., Fogaca, M. V., and Guimaraes, F. S. (2015). The endocannabinoid, endovanilloid and nitreergic systems could interact in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter to control anxiety-like behaviors. *Behav. Brain Res.* 293, 182–188. doi: 10.1016/j.bbr.2015.07.019

- Cornelio, A. M., and Nunes-de-Souza, R. L. (2009). Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? *Physiol. Behav.* 96, 440–447. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.11.007
- Cristino, L., De Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., and Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139, 1405–1415. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.074
- de Freitas, R. L., De Oliveira, R. C., De Oliveira, R., Paschoalin-Maurin, T., De Aguiar Correa, F. M., and Coimbra, N. C. (2014). The role of dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal gray matter and in situ 5-HT(2)A and 5-HT(2)C serotonergic receptors in post-ictal antinociception. *Synapse* 68, 16–30. doi: 10.1002/syn.21697
- Eschaler, A., Kayser, V., and Guilbaud, G. (1989). Influence of a specific 5-HT3 antagonist on carrageenan-induced hyperalgesia in rats. *Pain* 36, 249–255. doi: 10.1016/0304-3959(89)90030-4
- Fenwick, A. J., Fowler, D. K., Wu, S. W., Shaffer, F. J., Lindberg, J. E. M., Kinch, D. C., et al. (2017). Direct anandamide activation of TRPV1 produces divergent calcium and current responses. *Front. Mol. Neurosci.* 10:200. doi: 10.3389/fnmol.2017.00200
- Gewehr, C., Da Silva, M. A., Dos Santos, G. T., Rossato, M. F., De Oliveira, S. M., Drewes, C. C., et al. (2011). Contribution of peripheral vanilloid receptor to the nociception induced by injection of spermine in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 775–781. doi: 10.1016/j.pbb.2011.07.002
- Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., and Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res. Rev.* 60, 214–225. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.009
- Hohmann, A. G., Suplita, R. L., Bolton, N. M., Neely, M. H., Fegley, D., Mangieri, R., et al. (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435, 1108–1112. doi: 10.1038/nature03658
- Jensen, T. S., and Yaksh, T. L. (1989). Comparison of the antinociceptive effect of morphine and glutamate at coincidental sites in the periaqueductal gray and medial medulla in rats. *Brain Res.* 476, 1–9. doi: 10.1016/0006-8993(89)91529-1
- Lichtman, A. H., and Martin, B. R. (1996). Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology (Berl)* 126, 125–131. doi: 10.1007/BF02246347
- Lisboa, S. F., and Guimaraes, F. S. (2012). Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 62, 2455–2462. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.02.008
- Maione, S., Bisogno, T., De Novellis, V., Palazzo, E., Cristino, L., Valenti, M., et al. (2006). Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 969–982. doi: 10.1124/jpet.105.093286
- Marinelli, S., Di Marzo, V., Florenzano, F., Fezza, F., Viscomi, M. T., Van Der Stelt, M., et al. (2007). N-arachidonoyl-dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors. *Neuropsychopharmacology* 32, 298–308. doi: 10.1038/sj.npp.1301118
- Mascarenhas, D. C., Gomes, K. S., and Nunes-De-Souza, R. L. (2013). Anxiogenic-like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice. *Behav. Brain Res.* 250, 308–315. doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.023
- Mascarenhas, D. C., Gomes, K. S., and Nunes-De-Souza, R. L. (2015). Role of TRPV1 channels of the dorsal periaqueductal gray in the modulation of nociception and open elevated plus maze-induced antinociception in mice. *Behav. Brain Res.* 292, 547–554. doi: 10.1016/j.bbr.2015.07.023
- McGaraghty, S., Chu, K. L., Bitner, R. S., Martino, B., El Kouhen, R., Han, P., et al. (2003). Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. *J. Neurophysiol.* 90, 2702–2710. doi: 10.1152/jn.00433.2003
- Meng, I. D., and Johansen, J. P. (2004). Antinociception and modulation of rostral ventromedial medulla neuronal activity by local microinfusion of a cannabinoid receptor agonist. *Neuroscience* 124, 685–693. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.10.001
- Meng, I. D., Manning, B. H., Martin, W. J., and Fields, H. L. (1998). An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature* 395, 381–383. doi: 10.1038/26481
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00009-6
- Moreau, J. L., and Fields, H. L. (1986). Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. *Brain Res.* 397, 37–46. doi: 10.1016/0006-8993(86)91367-3
- Moreira, F. A., Aguiar, D. C., and Guimaraes, F. S. (2007). Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 52, 958–965. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.10.013
- Morena, M., and Campolongo, P. (2014). The endocannabinoid system: an emotional buffer in the modulation of memory function. *Neurobiol. Learn. Mem.* 112, 30–43. doi: 10.1016/j.nlm.2013.12.010
- Morgan, M. M., Reid, R. A., Stormann, T. M., and Lautermilch, N. J. (2014). Opioid selective antinociception following microinjection into the periaqueductal gray of the rat. *J. Pain* 15, 1102–1109. doi: 10.1016/j.jpain.2014.07.008
- Olango, W. M., Roche, M., Ford, G. K., Harhen, B., and Finn, D. P. (2012). The endocannabinoid system in the rat dorsolateral periaqueductal grey mediates fear-conditioned analgesia and controls fear expression in the presence of nociceptive tone. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2549–2560. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01478.x
- Palazzo, E., de Novellis, V., Marabese, I., Cuomo, D., Rossi, F., Berrino, L., et al. (2002). Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. *Eur. J. Pharmacol.* 439, 69–75. doi: 10.1016/S0014-2999(02)01367-5
- Palazzo, E., Marabese, I., Luongo, L., Boccella, S., Bellini, G., Giordano, M. E., et al. (2013). Effects of a metabotropic glutamate receptor subtype 7 negative allosteric modulator in the periaqueductal grey on pain responses and rostral ventromedial medulla cell activity in rat. *Mol. Pain* 9:44. doi: 10.1186/1744-8069-9-44
- Palazzo, E., Rossi, F., and Maione, S. (2008). Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, S79–S83. doi: 10.1016/j.mce.2008.01.013
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Pearlman, R. J., Aubrey, K. R., and Vandenberg, R. J. (2003). Arachidonic acid and anandamide have opposite modulatory actions at the glycine transporter, GLYT1a. *J. Neurochem.* 84, 592–601. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01549.x
- Ross, R. A., Gibson, T. M., Brockie, H. C., Leslie, M., Pashmi, G., Craib, S. J., et al. (2001). Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 132, 631–640. doi: 10.1038/sj.bjp.0703850
- Salat, K., Moniczewski, A., and Librowski, T. (2013). Transient receptor potential channels - emerging novel drug targets for the treatment of pain. *Curr. Med. Chem.* 20, 1409–1436. doi: 10.2174/09298673113209990107
- Siegfried, B., Netto, C. A., and Izquierdo, I. (1987). Exposure to novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. *Behav. Neurosci.* 101, 436–438. doi: 10.1037/0735-7044.101.3.436
- Starowicz, K., Maione, S., Cristino, L., Palazzo, E., Marabese, I., Rossi, F., et al. (2007). Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J. Neurosci.* 27, 13739–13749. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3258-07.2007
- Suplita, R. L. II, Farthing, J. N., Gutierrez, T., and Hohmann, A. G. (2005). Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology* 49, 1201–1209. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.07.007
- Ulugol, A. (2014). The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. *Balkan Med. J.* 31, 115–120. doi: 10.5152/balkanmedj.2014.13103
- Van Der Stelt, M., and Di Marzo, V. (2004). Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur. J. Biochem.* 271, 1827–1834. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04081.x
- Vaughan, C. W., Connor, M., Bagley, E. E., and Christie, M. J. (2000). Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol. Pharmacol.* 57, 288–295.

- Wang, H., and Wessendorf, M. W. (2002). Mu- and delta-opioid receptor mRNAs are expressed in periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 109, 619–634. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00328-1
- Wilson-Poe, A. R., Mitchell, V. A., and Vaughan, C. W. (2013). Postsynaptic mGluR mediated excitation of neurons in midbrain periaqueductal grey. *Neuropharmacology* 66, 348–354. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.057
- Xiong, W., Hosoi, M., Koo, B. N., and Zhang, L. (2008). Anandamide inhibition of 5-HT_{3A} receptors varies with receptor density and desensitization. *Mol. Pharmacol.* 73, 314–322. doi: 10.1124/mol.107.039149
- Yaksh, T. L., and Noueihed, R. (1985). The physiology and pharmacology of spinal opiates. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 433–462. doi: 10.1146/annurev.pa.25.040185.002245
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., et al. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457. doi: 10.1038/22761

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Mascarenhas, Gomes, Sorregotti and Nunes-de-Souza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.