

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



“EFECTO DEL LEVETIRACETAM EN LA RESPUESTA NOCICEPTIVA SOBRE LOS  
RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> Y 5-HT<sub>7</sub> EN TÁLAMO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA  
MODULACIÓN DEL DOLOR”

T E S I S

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A

M. en C. Cortes Altamirano José Luis

CO-TUTORES

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Dr. Alfonso Alfaro Rodríguez

ASESOR

Dr. Paul Carrillo Mora

CDMX, MÉXICO.

25/05/2018

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

**José Luis Cortes Altamirano**, el día 25 de Mayo del 2018.

Jurado:

*Cotutor:* Dra. Herlinda Bonilla Jaime.

---

*Cotutor:* Dr. Alfonso Alfaro Rodríguez.

---

*Asesor:* Dr. Paul Carrillo Mora.

---

*Sinodal:* Dra. Denise Clavijo Cornejo.

---

*Sinodal:* Dr. Antonio Bueno Nava.

---

## **DEDICATORIA**

A mis padres,

Gracias por el apoyo, esfuerzo y cariño que me han brindado en todo momento.

Los amo eternamente.

A Daniela Encinas de la Torre,

Por todo tu apoyo, amor y fiel compañía hasta el final, te amo.

A mi hermana,

Por siempre estar a mi lado y demostrarme que la felicidad esta en hacer lo que mas te gusta, te amo.

Especial dedicatoria al próximo miembro de esta hermosa familia,

Aún no te conocemos pero ya te amamos!

## AGRADECIMIENTOS

*“Pasó ya el tiempo en el que un sólo hombre  
aislado podía realizar investigaciones completas,  
hoy debe trabajarse en grupos y con espíritu de  
colaboración y ayuda”  
Bernardo A. Hossay*

Gracias por su apoyo, valiosas aportaciones y enseñanzas, en el desarrollo de este trabajo a:

Dra. Herlinda Bonilla Jaime.

Dr. Alfonso Alfaro Rodríguez.

Dr. Paul Carrillo Mora.

Dra. Denise Clavijo Cornejo.

Dr. Antonio Bueno Nava.

Biol. Samuel Reyes Long.

Biol. Mónica Santamaría Olmedo.

Dr. Alberto Avila Luna.

Dr. Arturo Gálvez Rosas.

Dra. Cindy Bandala.

Dr. Marwin Gutiérrez.

Al Departamento de Neurociencias del instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, Al departamento de Biología de la Reproducción en la UAM-Iztapalapa. Y a todos los que aportaron de una u otra manera en el desarrollo de este trabajo.

**MUCHAS GRACIAS!!!!**

**JOSÉ LUIS CORTES ALTAMIRANO**, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y  
Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU No. 254774).

## RESUMEN

El Levetiracetam (LEV) es un fármaco novedoso utilizado para el tratamiento de la epilepsia y debido a sus propiedades farmacocinéticas, además se han generado nuevas líneas de investigación donde se postula al LEV como fármaco antinociceptivo, sin embargo, los resultados de dichas investigaciones han sido controversiales y a la fecha no se ha esclarecido el mecanismo de acción del LEV. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la administración intragástrica (i.g.) del LEV en ratas sometidas a la prueba de formalina sobre la nocicepción y la expresión de los receptores a serotonina 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> localizados en tálamo. Este estudio fue dividido en tres fases experimentales, en todas las fases se utilizaron ratas de la cepa Wistar, únicamente machos, con un peso promedio de 250 g. En la primer fase y con el objetivo de evaluar el efecto antinociceptivo del LEV, los animales fueron aleatorizados en tres grupos y se sometieron a prueba de formalina, al grupo control (n = 6) se les administraron 50 µL de formalina al 1% vía subcutánea (s.c) en la parte dorsal de la pata, a las ratas del grupo Sham se les administraron 50 µL de solución salina para imitar el aplicación de formalina, y al grupo LEV 300, se le administró una dosis única por vía intragástrica (i.g.) de 300 mg/kg, 40 minutos después se les realizó la prueba de formalina. En la segunda fase de experimentación y con el objetivo de evaluar el efecto dosis respuesta del LEV, los animales fueron divididos en seis grupos (N = 36); al grupo control se les administraron 50 µL de formalina al 1%, a las ratas del grupo sham se les administraron 50 µL de solución salina, y a los cuatro grupos experimentales se les administró LEV i.g. a dosis crecientes (50, 100, 200 y 300 mg/kg), 40 min después se

les realizó la prueba de formalina. Por último, en la tercer fase experimental y con el objetivo de evaluar la expresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo, los animales fueron divididos en seis grupos (N = 36); grupo control, solo se le realizó la extracción del tálamo; en los grupos LEV 50 y LEV300, se administró una dosis única de 50 mg/kg y 300 mg/kg de LEV i.g. respectivamente, 100 min después se realizó la disección del tálamo; en el grupo Formalina; se les realizó la prueba de formalina e inmediatamente después se realizó la disección del tálamo; en los grupos LEV 50/formalina y LEV 300/formalina, a los animales se les administró 50 mg/kg y 300 mg/kg de LEV i.g. respectivamente, 40 min después se les realizó la prueba de formalina, finalizando la prueba se realizó la disección del tálamo. El tejido en todos los grupos, fue conservado a menos 80° centígrados para su posterior análisis por RT-PCR tiempo real. En las pruebas conductuales LEV exhibió un efecto antinociceptivo en el grupo LEV de 300 mg/kg ( $p < 0.05$ ) y un efecto pronociceptivo en el grupo LEV de 100 mg/kg ( $p < 0.05$ ) y en el grupo LEV de 50 mg/kg ( $p < 0.001$ ). Por otra parte, los resultados obtenidos por la técnica de PCR tiempo real, confirma la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo, el receptor 5-HT<sub>1A</sub> aumentó significativamente en el grupo formalina y grupo LEV300 con formalina ( $p < 0.05$ ). El receptor 5-HT<sub>7</sub> solamente se sobre expresa a dosis de 300 mg/kg de LEV con formalina ( $p < 0.05$ ). Podemos concluir que el efecto antinociceptivo y pronociceptivo de LEV en un modelo de dolor persistente es dosis dependiente, y a su vez, mencionar que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> talámicos son capaces de modular la respuesta nociceptiva y se ven modificados con la administración de LEV en presencia del estímulo doloroso.



## ABSTRACT

Levetiracetam (LEV) is a novel drug used for the treatment of epilepsy and due to its pharmacokinetic properties, new lines of research have been created where the LEV is postulated as an antinociceptive drug, however, the results of these investigations have been controversial and the mechanism of action of the LEV has not been clarified. The objective of this investigation was to determine the participation of the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the thalamus when LEV is administered on the nociceptive response. Male rats of the Wistar strain with an average weight of 250 grams were used. The animals were randomized into six groups and subjected to formalin testing as follows: in the control group was administered 50  $\mu$ L of 1% formaldehyde in the right hind paw as part of the formalin test, in the sham group was administered with 50  $\mu$ L of saline solution in the paw to mimic the application of formalin; the four experimental groups were administered LEV (i.g.) (50, 100, 200 and 300 mg/kg), 40 min after administration of LEV they were tested for formalin. Immediately after the test was completed, the thalamus dissection was performed, which was preserved at 80  $-C^{\circ}$  for further analysis by RT-PCR. In the behavioral tests LEV showed an antinociceptive effect in the LEV group of 300 mg/kg ( $p < 0.05$ ) and a pronociceptive effect in the LEV group of 100 mg/kg ( $p < 0.05$ ) and in the LEV group of 50 mg/kg ( $p < 0.001$ ). On the other hand, the results obtained by the RT-PCR assay assures us the expression of the 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the thalamus, the 5-HT<sub>1A</sub> receptor at this level was significantly increased in the group formalin and group LEV300 with formalin ( $p < 0.05$ ). On the other hand, the 5-HT<sub>7</sub>

receptor is not modified by the painful stimulus, however, it is over-expressed at a dose of 300 mg/kg of LEV ( $p < 0.05$ ). We can conclude that the antinociceptive and pronociceptive effect of LEV in a persistent pain model is dose-dependent, and it is important to mention that the 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> thalamic receptors are capable of modulating the nociceptive response and are modified with the administration of LEV in the presence of painful stimulation.

---

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Sistema Somatosensorial.....	4
2.1.1 Dolor nociceptivo.....	5
2.1.2 Tálamo y su participación en la percepción del dolor.....	8
2.2 Modelos animales de dolor.....	9
2.2.1 Prueba de formalina.....	11
2.3 Serotonina (5-HT).....	14
2.4 Levetiracetam.....	18
2.4.1 Fórmula química y farmacocinética.....	19
3. ANTECEDENTES.....	22
3.1 Receptor 5-HT <sub>1</sub> como modulador del dolor.....	22
3.2 Receptor 5-HT <sub>7</sub> como modulador del dolor.....	25
3.3 Levetiracetam como fármaco antinociceptivo.....	30
3.3.1 Estudios preclínicos.....	30
3.3.2 Estudios clínicos.....	32
4. JUSTIFICACIÓN.....	33
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	36
6. HIPÓTESIS.....	37
7. OBJETIVOS.....	38
7.1 Objetivo general.....	38
7.2 Objetivos específicos.....	38
8. MÉTODOLÓGÍA.....	39
8.1 Tipo de animales y localización.....	39
8.2 Condiciones de alojamiento.....	39
8.3 Habitación de las ratas para su manejo.....	40
8.4 Número de animales y formación de grupos.....	40
8.4.1 Evaluación del efecto nociceptivo del Levetiracetam.....	40

8.4.2 Evaluación de la dosis respuesta del Levetiracetam.....	42
8.4.3 Evaluación de la expresión de los receptores a serotonina 5-HT <sub>1A</sub> Y 5-HT <sub>7</sub> .....	43
8.5 Prueba con formalina (Modelo de dolor persistente).....	45
8.6 Extracción del Tálamo.....	47
8.7 RT-PCR tiempo real.....	47
8.8 Análisis estadísticos.....	50
9. RESULTADOS.....	51
9.1 Efecto nociceptivo del Levetiracetam.....	51
9.2 Dosis respuesta del Levetiracetam.....	53
9.3 Expresión de receptores 5-HT <sub>1A</sub> y 5-HT <sub>7</sub> en el tálamo.....	61
10. DISCUSIÓN.....	69
10.1 Efecto dosis respuesta del Levetiracetam.....	69
10.2 Expresión de receptores 5-HT <sub>1A</sub> y 5-HT <sub>7</sub> en el tálamo.....	71
10.3 Mecanismo de acción del Levetiracetam.....	74
11. CONCLUSIONES.....	77
12. PERSPECTIVAS E IMPLICACIONES.....	78
13. REFERENCIAS.....	79
ANEXO. PUBLICACIONES.....	100
• <i>Levetiracetam as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug</i>	
• <i>Review: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub> Receptors and their Role in the     Modulation of Pain Response in the Central Nervous System</i>	
• <i>Antinociceptive and pronociceptivo effect of levetiracetam in tonic pain     model</i>	

## Índice de Cuadros

## Páginas

---

<i>Cuadro 1.- Receptor 5-HT<sub>1</sub> como modulador del dolor nociceptivo.....</i>	24
<i>Cuadro 2.- Receptor 5-HT<sub>7</sub> como modulador del dolor nociceptivo.....</i>	29
<i>Cuadro 3.- Formación de grupos para la evaluación de la curva dosis respuesta del LEV.....</i>	43
<i>Cuadro 4.- Secuencias de los cebadores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> utilizados en este estudio.....</i>	49
<i>Cuadro 5.- Efecto del Levetiracetam en la prueba de formalina.....</i>	52
<i>Cuadro 6.- Efecto dosis respuesta del Levetiracetam en la prueba de formalina.....</i>	55
<i>Cuadro 7.- Efecto del Levetiracetam a dosis altas y dosis bajas en la prueba de formalina.....</i>	62

## Índice de Figuras

## Páginas

---

<i>Figura 1.- Vía del dolor nociceptivo.....</i>	7
<i>Figura 2.- Pruebas de dolor aplicadas a modelos animales en la investigación científica.....</i>	9
<i>Figura 3.- Estructura química de la Serotonina.....</i>	14
<i>Figura 4.- Receptores 5-HT involucrados en la modulación del dolor.....</i>	17
<i>Figura 5.- Estructura química del Levetiracetam.....</i>	20
<i>Figura 6.- Línea del tiempo de la evaluación del efecto nociceptivo del LEV.....</i>	41
<i>Figura 7.- Línea del tiempo de la evaluación de la administración del LEV sobre la expresión de los receptores talámicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en la prueba de formalina.....</i>	45
<i>Figura 8.- Línea del tiempo de la extracción del RNA del tálamo.....</i>	48
<i>Figura 9. Amplificación del receptor 5-HT<sub>1A</sub>.....</i>	65
<i>Figura 10. Amplificación del receptor 5-HT<sub>7</sub>.....</i>	66

<b>Índice de Gráficas</b>	<b>Páginas</b>
<i>Gráfica 1.- Efecto del Levetiracetam intragástrico en la prueba de formalina.....</i>	53
<i>Gráfica 2- Efecto del Levetiracetam intragástrico a dosis altas en la prueba de formalina.....</i>	56
<i>Gráfica 3- Efecto del Levetiracetam intragástrico a dosis bajas en la prueba de formalina.....</i>	57
<i>Gráfica 4. Comparación del número total de sacudidas de los animales en la etapa 1.....</i>	59
<i>Gráfica 5. Comparación del número total de sacudidas de los animales de la etapa 2.....</i>	60
<i>Gráfica 6- Efecto del Levetiracetam intragástrico a 50 mg/kg y 300 mg/kg en la prueba de formalina.....</i>	63
<i>Gráfica 7. Comparación del número total de sacudidas de los animales en la etapa I y la etapa II en la expresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub>.....</i>	64
<i>Gráfica 8. Comparación de la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el tálamo de rata.....</i>	67
<i>Gráfica 9. Comparación de la expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo de rata.....</i>	68

## 1. INTRODUCCIÓN

El dolor fue definido por la “Asociación Internacional del Estudio del Dolor” como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con el riesgo real o potencial de daño tisular (Loeser y Treede, 2008), el dolor se puede clasificar tomando en cuenta numerosos criterios; los más utilizados se basan en el mecanismo neurofisiológico, en el aspecto temporal, en la intensidad, en la etiología y en la región afectada (Debono y cols. 2013). El dolor es un mecanismo de defensa, cuando se pierde la homeostasis de los procesos que lo integran y lo regulan se vuelve patológico (crónico y debilitante), esta transición implica cambios en el sistema nervioso (SN), médula espinal y cerebro que aún no son totalmente comprendidos. Se estima que el dolor es la causa más común de consulta médica en los Estados Unidos y que aproximadamente 100 millones de individuos en este mismo país viven con dolor crónico (Debono y cols. 2013).

En nuestro país no hay datos epidemiológicos, sin embargo, las cifras del “Instituto Mexicano del Seguro Social” (IMSS) reportan que, dentro de los 20 motivos principales de consulta, durante el periodo de 1991 a 2002, por lo menos el 5% de los individuos que acudieron a los centros de medicina familiar presentaron una enfermedad dolorosa crónica claramente documentada (Covarrubias-Gómez y cols. 2010). El dolor influye en factores biomecánicos, generando discapacidad de los movimientos del paciente, lo que dificulta actividades tanto de la vida diaria, laborales, profesionales, sociales, como en el estado de ánimo (depresión y ansiedad) aspectos que definitivamente alteran la calidad de vida de la persona y de su entorno, estos datos muestran la necesidad de buenos tratamientos para la

rehabilitación de la condición dolorosa, así mismo, reflejan la importancia del dolor a nivel de la salud pública y el impacto que puede ejercer en la economía del país y la calidad de vida de los mexicanos. El dolor se divide en: dolor nociceptivo y dolor neuropático. El dolor nociceptivo es causado por la estimulación de un sistema nervioso intacto que funciona de forma normal, en tanto, el dolor neuropático es el resultado de un daño o enfermedad que afecta el sistema somatosensorial generando estímulos dolorosos persistentes (Jacobs, 2018).

Debido a la gran importancia que se le ha dado en los últimos años al uso de medicamentos antiepilépticos para el tratamiento del dolor y los nuevos blancos moleculares que podrían estar alterando los estímulos nociceptivos, se han generado varias líneas de investigación utilizando del Levetiracetam (LEV) como fármaco con efectos analgésico con resultados controversiales. El LEV tiene excelente perfil farmacocinético y se ha utilizado en muchas situaciones clínicas complejas, la biodisponibilidad oral del LEV es de más de 95%, se alcanza la concentración plasmática máxima aproximadamente una hora después de la administración oral (Radtke, 2001). El LEV se excreta principalmente inalterada a través de los riñones y su vida media es de  $7 \pm 1$  horas en adultos (Patselas, 2004; Rossi y cols. 2009). Para dilucidar el perfil antinociceptivo de LEV más a detalle, varios investigadores han postulado que este efecto es dependiente del sistema serotoninérgico (Micov y cols. 2015).

La serotonina (5-hidroxitriptamina, [5-HT]) es una monoamina distribuida ampliamente, tanto en el sistema nervioso periférico (SNP), como en el sistema nervioso central (SNC). Participa en trastornos fisiológicos y del comportamiento,



tales como la depresión, ansiedad, esquizofrenia, manías, autismo, obesidad, dolor, etc. La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano (de la dieta), por hidroxilación y descarboxilación secuencial. La 5-HT ejerce su acción activando a siete tipos de receptores (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>), que, a su vez, comprenden 15 subtipos (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>5B</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>), cada uno de ellos codificados por genes distintos, los receptores involucrados en la nocicepción son cuatro 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>7</sub>. A la fecha, el papel nociceptivo de los receptores serotoninérgicos a nivel del SNP está bien establecido., Por el contrario, se han realizado muchos estudios donde se proponen a los receptores serotoninérgicos como moduladores de la respuesta nociceptiva nivel central, sin embargo, su acción parece ser muy variable y sigue siendo tema de debate entre los investigadores alrededor del mundo (Cortes-Altamirano y cols. 2018).

Por los motivos antes expuestos, el objetivo del trabajo es; Evaluar el efecto del LEV en modelos animales sometidos a la prueba de dolor persistente con formalina sobre la modificación de la expresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### ***2.1 Sistema Somatosensorial***

El sistema somatosensorial o somatosensitivo, es parte del sistema nervioso que se encarga de recibir estímulos tales como el tacto, la temperatura, la propiocepción (posición del cuerpo) y la nocicepción (dolor) del entorno, tanto interno como externo, procesa los estímulos y genera una respuesta adaptativa para salvaguardar la perfecta función del organismo. El sistema somatosensorial reacciona a los estímulos usando varios receptores: termorreceptores, mecanorreceptores, quimiorreceptores y nociceptores. La transmisión del estímulo viaja desde los receptores, pasando por las neuronas sensoriales (aférentes) en la periferia (piel, músculo y órganos), hasta neuronas más profundas dentro del sistema nervioso central, para finalizar en la corteza cerebral donde se lleva a cabo la percepción del estímulo para posteriormente generar una reacción (Jacobs, 2018).

Los receptores se activan dependiendo de la intensidad del estímulo, eso hace posible que podamos afirmar que una sensación es más intensa que otra. El recorrido del estímulo desde que es recibido por el receptor hasta que es interpretado por la corteza, por lo general consta de tres neuronas sensitivas: (I) La neurona primaria aferente, tiene su soma en el ganglio del nervio espinal, es la que recibe el estímulo y la transforma en un potencial de acción (impulso eléctrico); (II) la neurona sensorial secundaria, tiene su soma en la médula espinal y en el tronco del encéfalo, en el caso de los estímulos nociceptivos, los axones de muchas de estas neuronas terminan en el tálamo; (III) la neurona sensorial terciaria tiene su soma en

el núcleo ventral posterior del tálamo y finaliza en el giro postcentral situado en el lóbulo parietal donde el estímulo es codificado y catalogado. En el caso particular de este trabajo nos enfocaremos en la percepción del estímulo doloroso nociceptivo. Por tal motivo, es importante mencionar que el dolor se divide en: dolor nociceptivo y dolor neuropático, el dolor nociceptivo es causado por la estimulación de un sistema nervioso intacto que funciona de forma normal, en tanto, el dolor neuropático es derivado por una lesión o enfermedad que altere el sistema nervioso generando estímulos nociceptivos (Jacobs, 2018).

### ***2.1.1 Dolor nociceptivo***

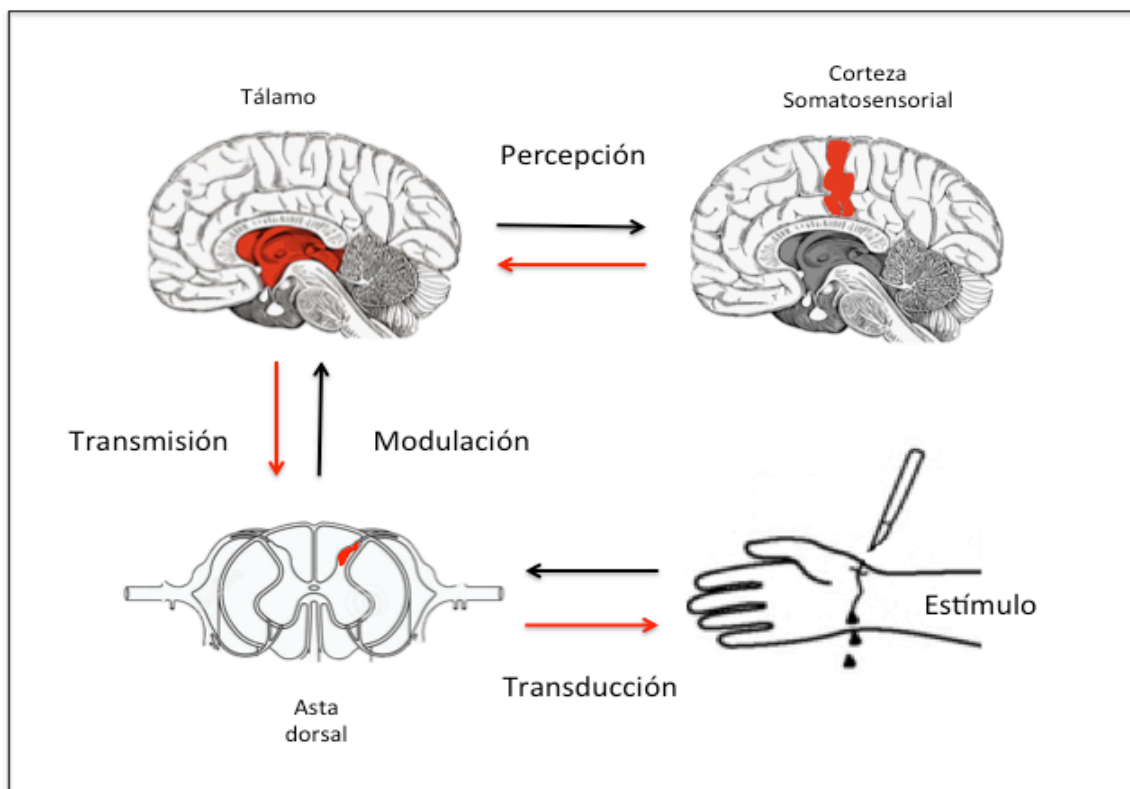
El dolor nociceptivo representa aquella forma de dolor que aparece en todos los individuos normales como consecuencia de la aplicación de estímulos que producen daño o lesión de órganos somáticos o viscerales. Entre el sitio activo del tejido dañado y la percepción del daño se producen una serie de eventos fisiológicos que colectivamente se denominan nocicepción, podemos dividir este proceso en cuatro etapas: transducción, proceso en el que los estímulos nocivos son convertidos en un potencial de acción a nivel de los receptores; transmisión, propagación del estímulo de manera ascendente a través de las vías del SNP y el SNC; modulación, proceso por el que la transmisión es atenuada en distintos niveles y percepción, la experiencia emocional y sensorial, como tal, subjetiva que se percibe como dolor (Kanner, 2006). (**Figura 1**).

Dentro de la fisiología del dolor nociceptivo la neurona aferente primaria es la primera neurona que recoge el estímulo doloroso, está situada en los ganglios

espinales de la médula y en los ganglios sensitivos de los nervios craneales 5°, 7°, 9° y 10°, del cuerpo celular sale un axón que se bifurca en uno periférico y otro central, el axón periférico viaja en el nervio periférico hacia la zona de inervación sensorial, dando lugar a las terminaciones nerviosas especializadas, los llamados nociceptores (Baron, 2000). Los nociceptores son despolarizados (activados) por estímulos nocivos térmicos, mecánicos o químicos, cuando los nociceptores son estimulados se despolarizan en relación directa con la intensidad del estímulo y la frecuencia con la que se aplica, la despolarización, se transmite pasivamente a lo largo de la membrana del receptor y cuando alcanza un umbral en la unión del receptor con el axón al que está conectado, genera un potencial de acción que se propaga a lo largo de la membrana axónica (Kanner, 2006).

Los axones de los nervios periféricos se clasifican como fibras A, B y C, las terminaciones distales de las fibras A y C son nociceptoras, y por tanto, transmiten estímulos dolorosos. Los axones aferentes primarios forman sinapsis con neuronas de la sustancia gris de la médula espinal, estas neuronas se distribuyen en diez capas conocidas como láminas de Rexed, las láminas I a VI están en el asta dorsal, las láminas VII a IX en la asta anterior y la X rodea al canal central. La información procedente de la piel termina de forma preferente en las láminas I, II y V y la procedente de las vísceras, músculos y otros tejidos profundos tienden a evitar la lámina II y terminar en las láminas I, V y X. Muchas neuronas del asta dorsal tienen un papel modulador de la señal nociceptiva y son interneuronas (Porreca y cols. 2002). Cuando el estímulo llega al asta dorsal de la médula espinal la segunda neurona capta el estímulo y lo transporta a través de las vías ascendentes del dolor.

Las vías ascendentes son conformadas por el tracto espinotalámico, el espinoreticular y el espinomesencefálico, las que se concentran principalmente en el cuadrante anterolateral de la médula espinal. El tracto espinotalámico es la mayor vía nociceptiva directa (alrededor del 90% de todas las vías ascendentes), se encuentra antero-lateralmente en la sustancia blanca de la médula espinal, sus axones cruzan la línea media, del lado contralateral de la médula espinal y ascienden hacia el tálamo, formación reticular, núcleo magno del rafe y a la sustancia gris periacueductal (Chudasama y Muir, 2001). Cuando el estímulo llega al tálamo, este realiza sinapsis con la tercera neurona que es la encargada de transportar el estímulo a la corteza somatosensorial donde se percibe propiamente el dolor.



**Figura 1.-** Vía del dolor nociceptivo. El estímulo viaja desde los Nociceptores hasta la corteza somatosensorial por medio del SNP y SNC.

### **2.1.2 El tálamo y su participación en la percepción del dolor**

El tálamo contiene una organización nuclear muy rica y a la fecha, se han identificado más de 20 núcleos talámicos. Se han propuesto varias clasificaciones de los núcleos que integran el tálamo, con base en una perspectiva evolutiva (Elliot, 1969), en características compartidas de conectividad de fibras y funciones (Afifi y Bergman, 1999), en criterios citoarquitectónicos y anatomofuncionales de los núcleos talámicos (Hirai y Jones, 1989; Morel y *co/s.* 1997). Se ha reportado que los núcleos ventroposterolateral, ventroposteromedial y los cuerpos geniculados son los encargados de modular las señales sensoriales, el núcleo ventroposterolateral recibe los tractos ascendentes largos que conducen las modalidades sensoriales, este núcleo envía eferencias al núcleo pulvinar y al núcleo lateral posterior, actúa como relevo para la información somática del cuerpo y las extremidades, ya que dirige sus proyecciones hacia la corteza somatosensorial primaria en la circunvolución poscentral en la que se analiza la información sensitiva cutánea, muscular, tendinosa, articular y visceral (Perena y *co/s.* 2000). El núcleo ventroposteromedial sirve de centro de relevo sensitivo talámico de la cabeza y la cara, las eferencias de este núcleo se dirigen a través de la cápsula interna hasta la corteza somestésica primaria del lóbulo parietal. El tálamo, junto con la corteza cerebral, desempeña un papel importante en el análisis e integración de las funciones sensitivas (Almeida y *co/s.* 2004). Las proyecciones talamocorticales, corticotalámicas y las propiedades neurofisiológicas de las fibras que ascienden o descienden hacia o desde la corteza cerebral son la base de las complejas relaciones entre los núcleos talámicos y la corteza cerebral. El tálamo es dependiente de varios neuromoduladores para ejercer

su acción, Yang y cols (2014) mostraron los receptores serotoninérgicos 5-HT1 presinápticos del tálamo como inhibidores en la acción sináptica talámica.

## 2.2 Modelos animales de dolor

La investigación sobre el dolor es necesaria si se quieren conocer nuevos aspectos clínicamente relevantes de los mecanismos de la nocicepción o de nuevos tratamientos farmacológicos. Hoy en día se han generado muchas investigaciones con objetivos diferentes relacionado con el dolor en modelos animales, en los cuales se han aplicado estímulos dolorosos (eléctrico, físico, químico, mecánico) con instrumentos, equipos o pruebas validadas y estandarizadas (retirada de cola “tail flick”, plato caliente “Hot plate”, formalina, carragenina, etc.) (Figura 2).

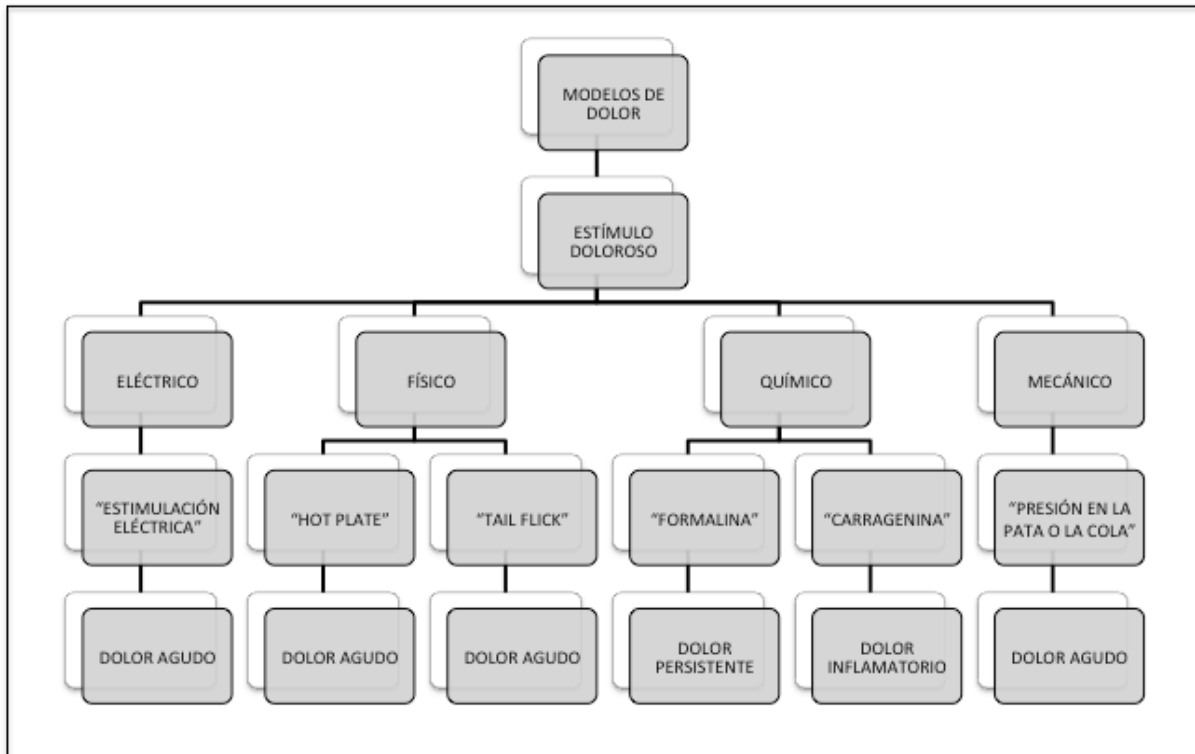


Figura 2.- Pruebas de dolor aplicadas a modelos animales en la investigación científica.

Los modelos de dolor que emplean los estímulos físicos provocan dolor agudo, “tail flick” y “hot plate” son las pruebas más utilizadas para este tipo de dolor.

#### “Tail flick”

El “tail flick”, es una prueba estandarizada y ampliamente validada, esta prueba emplea un rayo de luz térmico en la cola del animal que genera una sensación dolorosa, la ventaja de este modelo consiste en que el registro es automatizado y evalúa el tiempo que tarda el animal en retirar la cola ante el estímulo, una desventaja es el tiempo de reacción, debido a que este tiempo es diferente dependiendo del área donde se emplea el estímulo.

#### “Hot plate”

El “hot plate” es otro modelo que recurre al estímulo físico, registra la conducta dolorosa mediante el tiempo de reacción del animal cuando es colocado en una superficie caliente, al ser un modelo automatizado presenta una gran ventaja. Sin embargo, el animal presenta conductas diferentes durante la prueba (lamidas de extremidades, vocalización, micción, brincos, etc.) que podría ser una desventaja si se quiere registrar una sola conducta (Loscher y Schmidt, 1988).

Por otra parte, existen las pruebas que utilizan estímulos químicos que provocan dolor persistente o inflamatorio, por lo general estos modelos consisten en administrar agentes corrosivos casi siempre en la parte dorsal de la pata del animal. La prueba de formalina es un modelo de dolor persistente, está dividida en dos fases; la fase aguda y la fase tónica, se evalúa mediante la administración de formalina al 1 % en la pata de animal, esta administración genera una conducta



dolorosa en el animal (sacudida de la pata a la cual se le administró la formalina) que se registra durante un lapso de tiempo, este modelo es muy fácil de realizar, sin embargo, se requiere tomar en cuenta que se necesita de la experiencia de la persona que va a registrar la conducta dolorosa. En el caso de la prueba de carragenina, es un modelo de dolor inflamatorio que evalúa el grado de inflamación de la extremidad a la cual se le administró el estímulo químico, es un modelo muy fácil de aplicar y de registrar, es muy utilizado en muchas líneas de investigación (Dubuisson y Dennis 1978).

### ***2.2.1 Prueba de formalina***

El uso de formalina como agente nociceptivo fue precedido por el trabajo de Lewis (1939). El administró volúmenes pequeños de formalina en sujetos humanos para producir dolor experimental, posteriormente Selye (1949) y Winter (1965) usaron formalina como un estímulo en estudios de inflamación periférica en ratas y en 1974 Melzack y Melinkoff inyectaron una pequeña cantidad de formalina diluida como un estímulo nociceptivo en gatos. La formalina es la solución acuosa del 37% de formaldehído, algunos autores presentar la concentración de la solución de formalina como porcentaje de formaldehído, por lo tanto, un 10% de solución de formalina contiene aproximadamente 3.7% formaldehído, diversos volúmenes y concentraciones de formalina se han aplicado. Los volúmenes que con mayor frecuencia son administrados son 20-25  $\mu$ l en ratones y 30-100  $\mu$ l en ratas, las concentraciones más comunes de formalina que se han informado son del 1 al 5% (Dubuisson y Dennis 1978; Abbott y cols. 1982,1995, 1996; Hunskaar y cols. 1985; Wheeler-Aceto y cols. 1991; Tjolsen y cols. 1992).

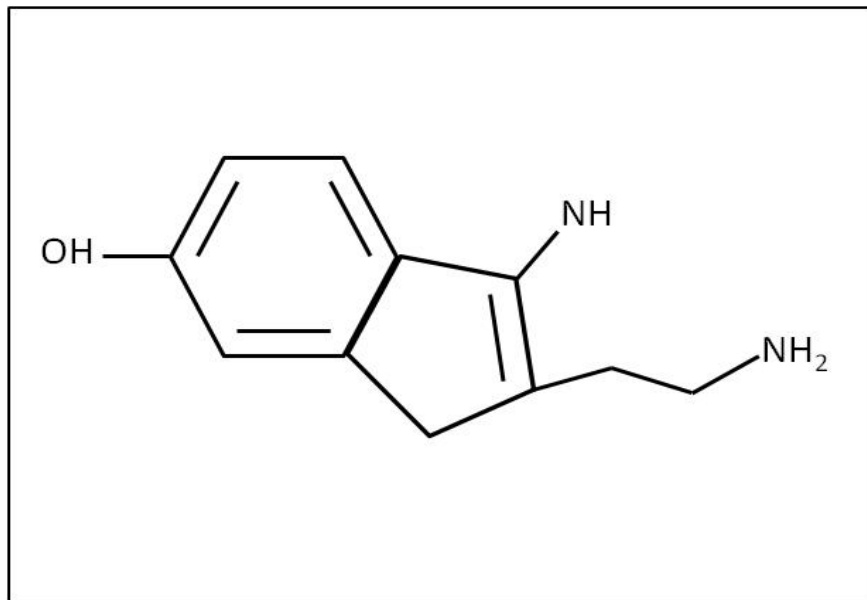
La prueba de formalina es un modelo de dolor persistente. En esta prueba, la primera etapa reflejaría un dolor nociceptivo agudo debido a la irritación química de la formalina subcutánea y su segunda etapa reflejaría un dolor persistente. Tiene la ventaja de que se producen una serie de signos que son contabilizables y son una medida del dolor que puede ser aliviado por la acción de los analgésicos. Se puede valorar desde un parámetro postural, posiciones protectoras de la extremidad afecta, pasando por un trabajo activo para aliviarlo, como puede ser el lamido de la zona afecta o un parámetro reflejo, como son las sacudidas de la extremidad. Uno de los inconvenientes técnicos de este test es que tiene un periodo de observación de una hora por cada animal y requiere una gran concentración y paciencia por parte del investigador. Por ello se han realizado intentos de mecanizar esta tarea mediante una valoración computarizada realizando un análisis de los comportamientos nociceptivos y de la actividad motriz mediante el procesamiento de las imágenes registradas por una cámara de video (Tjolsen y cols. 1992).

El estímulo proporcionado por la inyección subcutánea de la formalina es persistente, induciendo una respuesta de comportamiento con una duración de 1 h, a diferencia de las pruebas con estímulos mecánicos tales como el "Tail flick" o "Hot plate" el estímulo duradero de la prueba de formalina facilita la observación de la modulación de retroalimentación y el papel de sistemas endógenos de regulación del dolor, como el opioide y sistemas monoaminérgicos (Tjolsen y cols. 1992). En roedores, las dos etapas distintas de la prueba se pueden usar para abordar varios aspectos de la nocicepción ya que la primera etapa parece deberse a la estimulación de los nociceptores mientras que la segunda etapa depende de la inflamación

periférica y cambios en el SNC. La prueba puede tener más relevancia para situaciones clínicas que las pruebas que emplean medidas de reflejos nociceptivos o umbrales. Fármacos conocidos como analgésicos débiles en humanos, generalmente, tienen efectos antinociceptivos claros en la prueba de formalina en modelos animales (Hunskaar y *co/s.* 1985; Tjolsen y *co/s.* 1992). Por otra parte, los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) suelen tener efectos únicamente en la segunda fase de la prueba (Hunskaar y *co/s.* 1985). El dolor infligido a los animales tiene un límite de tiempo y es de corta duración, comparado con los modelos de dolor crónico, como la artritis inducida por lesiones. El registro de las respuestas de comportamiento en la prueba de formalina requiere algo de entrenamiento, pero las respuestas son adaptaciones de los componentes normales del comportamiento de los animales. Además, la similitud del tiempo del dolor provocado por la inyección de formalina en humanos y el patrón de comportamiento en animales, sugiere que las respuestas tanto en humanos como animales están estrechamente relacionadas con la experiencia sensorial al dolor. La prueba de formalina ha demostrado tener una importante contribución en la investigación básica del dolor, tiene ventajas considerables sobre otras pruebas y es considerada como una prueba estándar en modelos de dolor nociceptivo.

### 2.3 Serotonina (5-HT)

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es un neurotransmisor que se encuentra en el SNC, en el SNP y en sistemas no neuronales tales como: sistema sanguíneo, sistema gastrointestinal y sistema endocrino por mencionar algunos (**Figura 3**). Se estima que 5-HT haya aparecido hace unos 700-800 millones de años en organismos eucariontes unicelulares como los paramecios, lo que lo hace uno de los neurotransmisores más antiguos de la evolución. Sus receptores se encuentran en una diversidad muy amplia de organismos desde planarias, pasando por los insectos hasta el hombre y su estructura se presenta bien conservada (Hannon y Hoyer, 2008).



*Figura 3.- Estructura química de la Serotonina.*

Vitorio Esparmer fue el primero en describir la 5-HT en los 1900's, fue aislada del intestino y presentó actividad constrictora y fue llamada "enteramina". No fue sino hasta 1948 que se redescubrió a la 5-HT por el grupo de Page, Rapport y Green quienes la aislaron de la sangre y apropiadamente la nombraron "serotonina" debido

a que era liberada al “serum” desde las plaquetas. Eventualmente Maurice Rapport purificó, cristalizó y caracterizó a la serotonina de una gran cantidad de sangre, encontrando que la enteramina y la 5-HT eran la misma molécula y que posee un grupo indol, como fue sugerido antes por Esparmer, y se llegó a la conclusión de llamarla serotonina. Más tarde, en 1953, Betty Twarog e Irvin Page detectaron 5-HT en extractos de cerebro, siendo así que la serotonina se presentaba en tres sistemas claves del cuerpo; plaquetas, sistema gastrointestinal y sistema nervioso (Hannon y Hoyer, 2008).

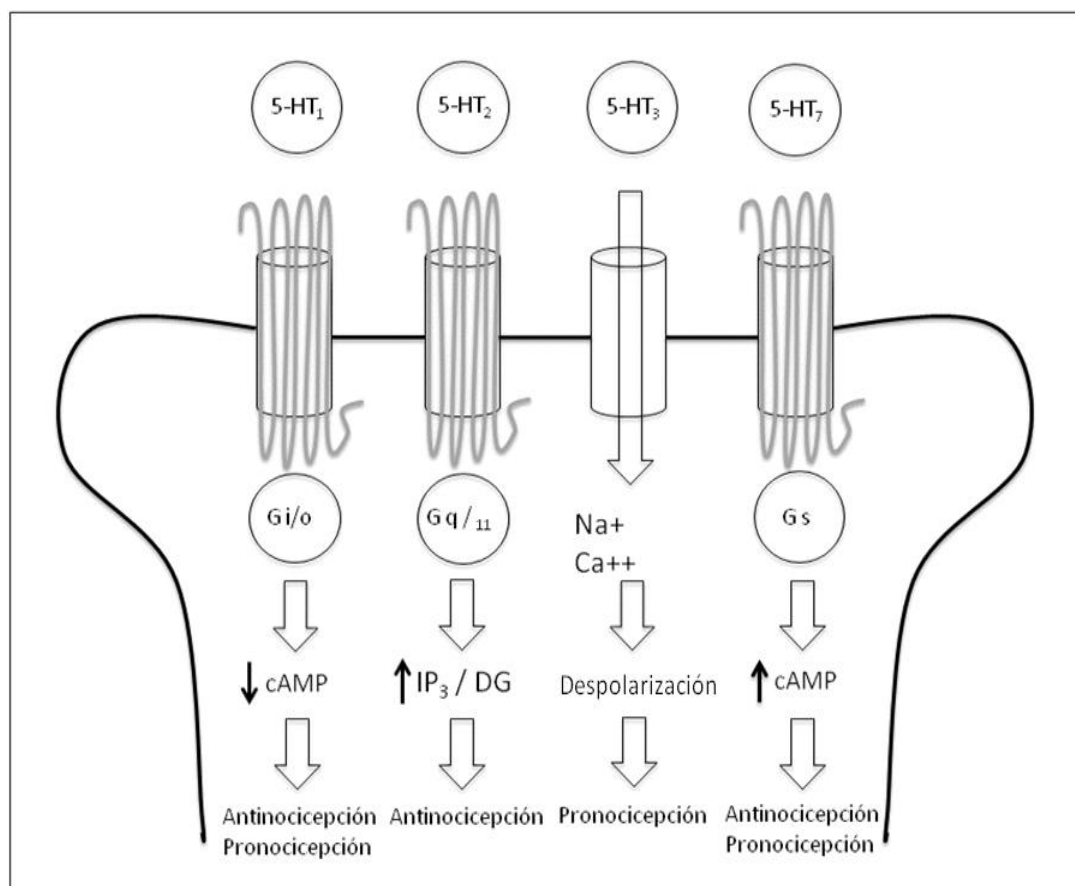
La 5-HT no atraviesa la barrera hematoencefálica por lo que su presencia en el SNC se limita sólo a su síntesis *in situ*, la cual se lleva a cabo en el núcleo del rafé y en sus proyecciones en el cerebro. El primer paso de la síntesis de 5-HT es el transporte facilitado del aminoácido triptófano de la sangre al cerebro, seguido, las neuronas serotoninérgicas contienen la enzima triptófano hidroxilasa (L-triptofano-5-monooxigenasa) la cual hidroxila al triptófano a 5-hdroxitriptofano (5-HTP) y, por último, la enzima L-amino ácido descarboxilasa convierte el 5-HTP a 5-HT. La degradación de 5-HT se lleva a cabo por la monoaminoxidasa (MAO) y en la glándula pineal por la 5-HT N-acetiltransferasa que degrada la 5-HT a melatonina.

La serotonina juega un papel muy importante en muchas funciones del sistema nervioso (Berger y cols. 2009), se le ha implicado en prácticamente cualquier tipo de conducta, por ejemplo, la modulación neuroendocrina ya que se ha descrito una conexión sináptica entre terminales serotoninérgicas y neuronas que contienen hormona liberadora de corticotropina y se encuentra dentro de los neurotransmisores que participan en el control hipotalámico de la secreción pituitaria

particularmente en la regulación de los niveles de adrenocorticotropina, prolactina y de la hormona del factor de crecimiento (Purves y cols. 2004). El núcleo del rafe magno medular contiene neuronas serotoninérgicas que proyectan a la médula espinal, es por este motivo que varios investigadores han implicado a la serotonina proveniente del sistema rafe-médula espinal en la modulación de la nocicepción (Bowker y cols. 1982). El área rostroventral de la médula medial proporcionan la principal vía descendente de 5-HT con dirección a el asta dorsal de la médula espinal (Millan, 2002). Axones que contienen 5-HT descienden desde el tallo cerebral y se proyectan tanto en el asta ventral y la columna intermediolateral, así como en el asta dorsal de la médula espinal (Belcher y cols. 1978). Hoy en día, la médula espinal se puede dividir en cuatro áreas, según su fisiología en relación con los receptores 5-HT, la primera es el asta dorsal que corresponde a la entrada principal de relevo de estímulos nociceptivos, el área intermediolateral es la segunda área y es aquí donde se origina las neuronas simpáticas preganglionares, el área central que podría estar involucrado en el intercambio con el fluido cerebro-espinal es la tercer área y por último el asta ventral que está implicada en las funciones motoras (Hains y cols. 2003).

También se ha establecido que las vías descendentes y ascendentes de 5-HT facilitan o inhiben el procesamiento espinal de la información nociocéptica (Bardin, 2011). Los receptores 5-HT son una familia de 7 tipos (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>) y 15 subtipos. Los receptores implicados en la vía nociocéptica son 4 (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>7</sub>) (Cortes-Altamirano y cols. 2018). El receptor 5-HT<sub>1</sub> se acopla con proteína G<sub>i/o</sub> y su acción es disminuir los niveles adenosín

monofosfato cíclico (AMPc) generando efectos antinociceptivos y pronociceptivos dependiendo de estímulo y la intensidad, en el caso del receptor 5-HT<sub>2</sub> es un receptor acoplado a la proteína G<sub>q/11</sub> el efecto de esta unión es el aumento de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y de diacilglicerol (DAG) generando antinocicepción en la mayoría de los casos, el receptor 5-HT<sub>3</sub> es el único receptor serotoninérgico ionotrópico de toda la familia de receptores despolariza la membrana de manera rápida y genera pronocicepción y mantiene el estímulo doloroso, finalmente el receptor 5-HT<sub>7</sub> es un receptor acoplado a proteína G<sub>s</sub>, su activación aumenta los niveles de AMPc generando un efecto pronociceptio o antinociceptivo (**Figura 4**) (Cortes-Altamirano y cols. 2018).



**Figura 4.-** Receptores 5-HT involucrados en la modulación del dolor

#### **2.4 Levetiracetam.**

El levetiracetam (LEV) es un fármaco antiepiléptico de segunda generación que pertenece a la familia de la pirrolidona, un fármaco con un amplio espectro de acción. El LEV posee un perfil farmacológico único comparado con los anticonvulsivantes tradicionales (Margineanu y *co/s.* 2008).

La molécula fue sintetizada en la década de 1980 durante un programa de seguimiento químico destinado a identificar una segunda generación de drogas nootrópicas, los estudios farmacológicos iniciales con LEV exploran su capacidad para facilitar la neurotransmisión colinérgica (Loscher y Schmidt, 1988). El LEV fue aprobado por la Food and Drug Administration de Estados Unidos (FDA) en 1999, y en Europa en el 2000 para su uso en pacientes adultos con crisis mioclónicas (Coppola y *co/s.* 2010), para la epilepsia mioclónica juvenil y para las convulsiones primarias tónico-clónicas generalizadas, fue aprobado en la India en 2005 como terapia coadyuvante en el tratamiento de las crisis parciales en adultos. Sin embargo, no fue hasta 2012 que la FDA aprobó LEV para su uso como terapia adyuvante en las crisis parciales de bebés y niños de 1 mes de edad y mayores (Cormier y Catherine, 2013). El LEV exhibe un excelente perfil farmacocinético y se ha utilizado en una amplia gama de situaciones clínicamente complejas (Swaroop y *co/s.* 2013).

El LEV ha demostrado ser eficaz en la prevención de muchas formas de epilepsia, se ha empleado como monoterapia (Ben-Menachem y Falter, 2000; Alsaadi y *co/s.* 2005; Lim y *co/s.* 2009), en tratamientos co-adyuvante (Lambrechts y

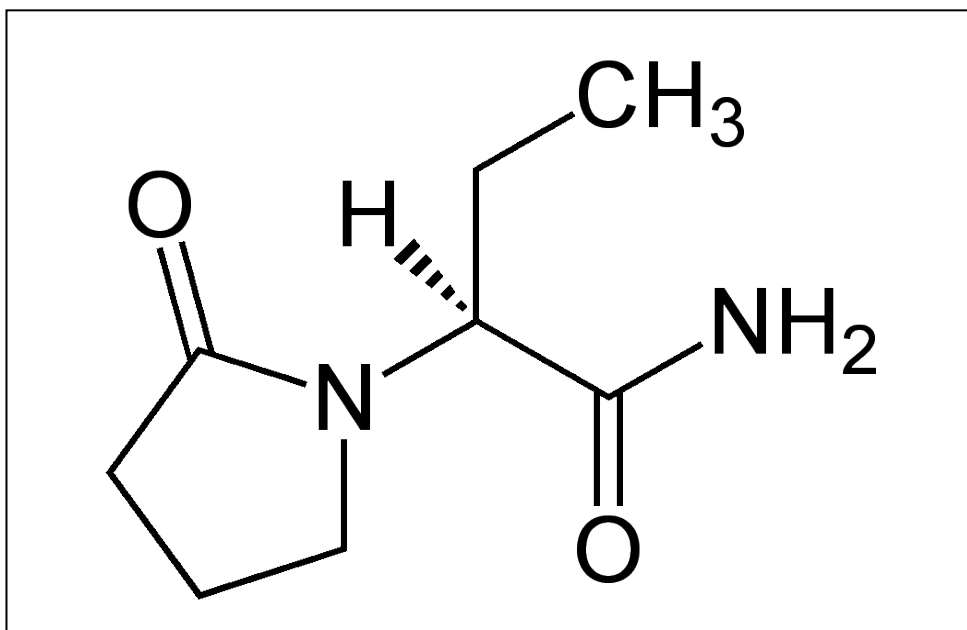


*cols.* 2006; Berkovic *y cols.* 2007; Noachtar *y cols.* 2008; Gurses *y cols.* 2008; Morrell *y cols.* 2003), para la prevención de convulsiones post-traumáticas (Milligan *y cols.* 2008; Jones *y cols.* 2008; Zachenhofer *y cols.* 2011; Bahr *y cols.* 2012) y recientemente la seguridad y eficacia del LEV ha sido reportada en las convulsiones neonatales (Lee *y cols.* 2010; Weinstock *y cols.* 2013; Ozkale *y cols.* 2014). Por otra parte, se han propuesto que el LEV posee propiedades neuroprotectoras en trastornos epilépticos (Eya *y cols.* 2004; Marini *y cols.* 2004; Gibbs y Cock, 2007; Oliveira *y cols.* 2007; Szaflarski *y cols.* 2010; Steinbaugh *y cols.* 2012; Lee *y cols.* 2013; Shetty, 2013) y no epilépticos (Madeja *y cols.* 2003; Wang *y cols.* 2006; Kim *y cols.* 2010).

Recientemente, evidencia experimental sugiere que el LEV tiene efectos antihiperalgésicos en modelos de dolor-inflamatorio (Micov *y cols.* 2010; Stepanovic-Petrovic *y cols.* 2012; Tomic *y cols.* 2013) modelos de dolor-tónico (Shannon *y cols.* 2005) y dolor neuropático (Brighina *y cols.* 2006; Ozcan *y cols.* 2008; Rossi *y cols.* 2009; Falah *y cols.* 2012; Cortes-Altamirano *y cols.* 2016). Sin embargo, al día de hoy el mecanismo específico de acción de LEV no ha sido esclarecido.

#### **2.4.1 Formula química y farmacocinética**

El LEV estructuralmente está relacionado con fármacos nootrópicos, su estructura química cuenta con C<sub>8</sub>, H<sub>14</sub>, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y el peso molecular relativo es 170.209 g/mol (**Figura 5**) (Crepeau y Treiman, 2010). La farmacocinética del LEV se ha considerado en los estudios preclínicos y clínicos (adultos y niños con epilepsia, adultos sanos, adultos mayores y pacientes con insuficiencia renal y hepática).



**Figura 5.-** Levetiracetam: Estructura Química (Extraído de Kozlowski y cols. 2015)

El LEV posee diversos atributos farmacocinéticos, es muy soluble en agua y puede estar libremente en sangre, fácilmente puede atravesar la barrera hematoencefálica, se absorbe rápidamente después de la ingestión oral, puede ser ingerida sin tener en cuenta las comidas, tiene una excelente biodisponibilidad (área bajo la curva [AUC]), cinética lineal, la variabilidad entre pacientes es poca, la unión a proteínas plasmáticas es mínima, se llega rápido a las concentraciones en estado estacionario y se metaboliza en el riñón (Kozlowski y cols. 2015). Entre los nuevos antiepilépticos, el LEV presenta muchas características favorables, tales como bajo potencial de interacción de medicamentos, sin efectos perjudiciales sobre el sueño, sin mayores efectos negativos sobre la cognición y mantiene su eficacia y seguridad durante las terapias a largo plazo. Benedetti y cols. (2004) compararon su farmacocinética en ratón, rata, conejo y perro, encontrando que la concentración de LEV fue mayor en la sangre que en los riñones, la glándula tiroides, y la glándula

pituitaria. Por otra parte, se reportó una concentración inferior en la grasa, la médula espinal, el cerebro y cerebelo comparado con su nivel en sangre. No hay diferencia en la absorción, la disposición y el metabolismo del LEV entre especies.

En niños, Pellock y cols. (2001) encontraron que el LEV posee diferencias en ciertos parámetros, (vida media, concentración máxima [C<sub>max</sub>] y AUC en promedio son menores en los niños, mientras que en los adultos son mayores) en los niños de 6-12 años pueden requerir dosis más altas de LEV que los adultos. La farmacocinética de LEV durante el embarazo, el parto, la lactancia y en el período neonatal fue estudiada por Tomson y cols. (2007) quienes determinaron las concentraciones de LEV en la leche, el plasma, sangre de las madres, del cordón umbilical de los recién nacidos y la leche materna fueron determinados. La conclusión final, indica una considerable transferencia de LEV de la placenta al neonato. Los autores demostraron una eliminación neonatal lenta de LEV y una disminución sorprendentemente marcada en las concentraciones plasmáticas maternas durante el embarazo. Toubanc y cols. (2015) evaluó la bioequivalencia entre dosis única (1500 mg) de infusión intravenosa (i.v.) comparada por vía oral y reportó que la administración i.v. de LEV es bioequivalente a la administración oral y no se ven alterado los parámetros farmacocinéticos.

### 3 ANTECEDENTES

#### 3.1 Receptor 5-HT<sub>1</sub> como modulador del dolor

Los receptores 5-HT<sub>1</sub> están presentes en el SNC y el SNP, son receptores acoplados a proteína G<sub>i/o</sub> y se dividen en 6 subtipos A, B, C, D, E y F. (Barnes y Sharp, 1999; Peroutka, 1988; Zemlan y cols. 1988). Diferentes subtipos del receptor 5-HT<sub>1</sub> contribuyen potencialmente en la regulación del dolor de la médula-espinal, concentrándose mayor cantidad en el asta dorsal de la médula espinal (Murphy y Zemlan, 1990; Zemlan y Schwab, 1991). La 5-HT produce tanto la inhibición como la excitación pre y post-sinápticos a nivel del asta dorsal (Grudt y cols. 1995; Hori, y cols. 1996; Ito y cols. 2000; Jeong y cols. 2012; Lu y Perl, 2007; Travagli y Williams, 1996). El receptor 5-HT<sub>1A</sub> ha sido el más estudiado en modelos de dolor y parece tener un papel modulador en la nocicepción (**Cuadro 1**), su amplia distribución en el SNC hace posible que las acciones de fármacos agonistas selectivos involucren mecanismos espinales y supra-espinales en procesos nociceptivos. Donde el receptor 5-HT<sub>1A</sub> parece jugar un papel importante en la mediación de efectos reguladores del dolor (Colpaert, 2006; Mico y cols. 2006). La presencia generalizada de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en la médula espinal, núcleos del rafe, así como en las zonas corticales y límbicas, sugiere una posible implicación de estos receptores en los estados emocionales, la cognición y la modulación del dolor (Hensler y cols. 1991).

El-Yassir y cols. (1988) reportaron que al utilizar un estímulo mecánico para ocasionar dolor tanto los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> están implicados en la nocicepción, de hecho, los receptores 5-HT<sub>1A</sub> parecen imitar los efectos

antinociceptivos no selectivos de 5-HT, mientras que los receptores 5-HT<sub>1B</sub> imitan el efecto selectivo. Este efecto se observa en el modelo de “tail flick” en ratones a los cuales se le administraron agonistas vía intraperitoneal de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub>, observándose la inhibición del dolor (Eide y *co/s.* 1990). Se ha propuesto que tanto los receptores 5-HT<sub>1A</sub> como los 5-HT<sub>1B</sub> están implicados en el dolor nociceptivo, están localizados en las neuronas del asta dorsal, esto se observó cuando se registró a las neuronas del asta dorsal durante la administración de fármacos agonistas y antagonistas de 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> demostrando un aumento de las respuestas nociceptivas sugiriendo que este efecto está asociado con la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mientras que la activación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> suprimen o reducen la nocicepción, (Ali y *co/s.* 1994). El aumento de la capacidad de respuesta de las neuronas del asta dorsal a la estimulación nociva asociada con la actividad en los receptores 5-HT<sub>1A</sub> puede estar asociado, ya sea con el aumento de tamaño del campo receptivo, la activación de los reflejos espinales o a la facilitación de la transmisión rostral a los sitios del tallo cerebral específicos. Estudios sobre los efectos moduladores de la activación del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en neuronas de la médula espinal muestran que, la estimulación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> parece tener efectos pro y anti-nociceptivo sobre las neuronas del asta dorsal después de la estimulación eléctrica repetida (Gjerstad y *co/s.* 1997). Además, estas neuronas del asta dorsal aumentan su excitabilidad después de la administración intratecal de agonistas 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> en un biomodelo de inflamación inducido con la inyección intraplantar de carragenina, que se caracteriza por una inflamación que causa una distribución restringida de la hiperalgesia (Zhang y *co/s.* 2001). Los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, están involucrados en la vía descendente de antinocicepción desde el tallo cerebral hasta

el asta dorsal de la médula espinal (Liu y cols. 2002). La estimulación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en la médula parece mediar la integración de los mecanismos nociceptivos, esto se observó al utilizar 5-HT exógeno o al administrar dos analgésicos (paracetamol y venlafaxina) que implican la modulación de 5-HT endógeno, induciendo efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina, sugiriendo que los fármacos analgésicos utilizados de manera frecuente parecen modular los receptores serotoninérgicos localizados en la médula (Bonnetfont y cols. 2005).

**Cuadro 1.- Receptor 5-HT<sub>1</sub> como modulador del dolor nociceptivo**

<b>AUTOR</b>	<b>MODELO ANIMAL</b>	<b>ESTÍMULO</b>	<b>TIPO DE DOLOR</b>	<b>PRUEBA CONDUCTUAL</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>
El Yassir y cols. 1998	RATA	MECÁNICO	NOCICEPTIVO AGUDO	PRESIÓN EN LA PATA	Los receptores 5-HT <sub>1A</sub> y 5-HT <sub>1B</sub> están implicados en la nocicepción a nivel del asta dorsal.
Eide y cols. 1990	RATÓN	FÍSICO	NOCICEPTIVO AGUDO	TAIL FLICK	Agonistas de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> y 5-HT <sub>1B</sub> inhiben la nocicepción.
Ali y cols. 1994,	RATA	FÍSICO	NOCICEPTIVO AGUDO	TAIL FLICK	Los receptores 5-HT <sub>1A</sub> aumentan la respuesta nociceptiva, por otra parte, los receptores 5-HT <sub>1B</sub> tiene el efecto de reducir la capacidad de respuesta.
Gjerstad y cols. 1997	RATA	ELÉCTRICO	NOCICEPTIVO AGUDO	ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA	Los receptores 5-HT <sub>1B</sub> puede tener efectos pro y anti-nociceptivo en el asta dorsal.
Zhang y cols. 2001	RATA	QUÍMICO	NOCICEPTIVO INFLAMATORIO	CARRAGENINA	La excitabilidad de las neuronas del asta dorsal aumentan después de la administración intratecal de agonistas para los receptores 5-HT <sub>1A</sub> y 5-HT <sub>1B</sub> .
Bonnetfont y cols. 2005	RATA	QUÍMICO	NOCICEPTIVO PERSISTENTE	FORMALINA	Los receptores 5-HT <sub>1A</sub> tiene efectos antinociceptivos.
Jeong y cols. 2012,	RATA	MECÁNICO	NOCICEPTIVO AGUDO	PRESIÓN EN LA PATA	Los receptores 5-HT <sub>1A</sub> , inhibe la transmisión sináptica nociceptiva.

Recientemente, Jeong y cols. (2012) caracterizaron el efecto de varios agonistas para los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> y 5-HT<sub>1F</sub> incluyendo al sumatriptán, en la médula espinal sobre el dolor agudo ocasionado por un estímulo mecánico, además de su efecto sobre la transmisión sináptica aferente en neuronas del asta dorsal superficial, sugirieron que a nivel celular, el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, inhibe la transmisión sináptica aferente primaria en una sub-población de la lámina II en el asta dorsal superficial.

### **3.2 Receptor 5-HT<sub>7</sub> como modulador del dolor**

El receptor 5-HT<sub>7</sub> es el miembro de la familia de receptores de la 5-HT descrito recientemente, un número creciente de estudios han descrito la distribución del receptor 5-HT<sub>7</sub> en roedores mediante técnicas de inmunohistoquímica (Belenky y Pickard, 2001; Bickmeyer y cols. 2002; Geurts y cols. 2002; Muneoka y Takigawa, 2003). Estos informes muestran que la distribución del ARNm del receptor 5-HT<sub>7</sub>, se localiza con mayor abundancia en el tálamo, el hipotálamo y el hipocampo (Hedlund y Sutcliffe, 2004; Kvachnina y cols. 2009). La isoforma 5-HT<sub>7A</sub> predomina a nivel del SNC, seguida de la variante 5-HT<sub>7B</sub>, mientras que las isoformas 5-HT<sub>7C</sub> y 5-HT<sub>7D</sub> se expresan con menos frecuencia (Vanhoenacker y cols. 2000). El receptor 5-HT<sub>7A</sub> fue la primera variante clonada de humano con una longitud de 445 aminoácidos, los receptores 5-HT<sub>7</sub> se encuentran principalmente en las láminas I y II superficiales del asta dorsal de la médula espinal (Meuser y cols. 2002). Una prueba realizada con microscopia electrónica del asta dorsal reveló localizaciones principales: cuerpos celulares peptidérgicos y en numerosas dendritas (localización postsináptica), fibras mielinizadas y amielínicas peptidérgicas y en los astrocitos (localización presináptica)

(Matthys y cols. 2011). El perfil farmacológico de los receptores 5-HT<sub>7</sub> es bastante similar al de los receptores del subtipo 5-HT<sub>1A</sub> (Hoyer y cols. 1994).

Los receptores 5-HT<sub>7</sub> parecen estar asociados principalmente con las divisiones del cerebro límbico ya que reciben aferencias serotoninérgicas (por ejemplo, el hipocampo, el complejo amigdalino, o núcleos mamilares). Esto sugiere que el receptor 5-HT<sub>7</sub> también está involucrado en la conducta del sueño, en la regulación térmica, el aprendizaje, el estado de ánimo, el estado neuroendocrino, dichas observaciones fueron confirmadas en una cepa de ratones no-caut para el gen 5-HT<sub>7</sub> interrumpido (Hedlund y cols. 2003; Ruat y cols. 1993). Un estudio previo mostró que el receptor 5-HT<sub>7</sub> está relacionado con las neuronas GABAérgicas del asta dorsal de la médula espinal (Brenchat y cols. 2010), y se han encontrado interneuronas espinales GABAérgicas expresan el receptor 5-HT<sub>7</sub> y estos receptores modulan procesos antinociceptivos, debido a estos hallazgos, los investigadores han realizado estudios que evalúan al receptor 5-HT<sub>7</sub> sobre la modulación de las respuestas nociceptivas (**Cuadro 2**).

Rocha-González y cols. (2005) realizaron un estudio donde el objetivo principal consistió en determinar la posible participación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> periféricos y locales en la respuesta nociceptiva en el modelo de formalina, los resultados electrofisiológicos, inmunohistoquímicos y de comportamiento, sugieren un papel pronociceptivo del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el asta dorsal de la médula espinal. Sin embargo, Dogrul y Seyrek, (2006) reportaron que, al administrar morfina vía sistémica, desencadena la activación de las vías descendentes serotoninérgicas, sugiriendo que los receptores 5-HT<sub>7</sub> en la médula espinal desempeña un papel



importante en la antinocicepción. Brenchat y cols. (2009) evaluaron el papel del receptor 5-HT<sub>7</sub> sobre la nocicepción en ratones sometidos al modelo de “tail flick”. Sus resultados mostraron que los receptores 5-HT<sub>7</sub> participan en los mecanismos antinociceptivos y el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>7</sub> por la administración intratecal del antagonista a receptores 5-HT<sub>7</sub> (SB-269970). Un par de años después los mismos investigadores realizaron un estudio donde evaluaron el efecto analgésico de la morfina co-administrada con el agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>7</sub> (E-55888), con el antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> (SB-258719), o en combinación de ambos, en ratones sometidos a los modelos de dolor nociceptivo utilizando las pruebas de “tail flick” y “hot plate”, los resultados revelan que los agonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub> tiene efectos positivos como co-adyuvantes en un esquema analgésico con opioides, sin embargo, la administración sistémica del agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>7</sub> “*per se*” no es suficiente para reproducir el efecto antinociceptivo ejercido por los opioides (Brenchat y cols. 2011).

La función de los receptores 5-HT<sub>7</sub> a nivel periférico y a nivel central sobre la modulación nociceptiva fue investigado por Brenchat y cols. (2012) los resultados muestran que la activación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> ejerce efectos antinociceptivos a nivel de la médula espinal y efectos pronociceptivos a nivel periférico. Dogrul y cols. (2012) evaluaron la participación de los receptores 5-HT<sub>7</sub>, en la médula espinal, sobre los efectos antinociceptivos y antihiperalgésicos del paracetamol en ratas sometidas a modelo de dolor físico utilizando las pruebas de “Tail Flick” y “Hot plate” demostrando que la activación de las vías descendentes serotoninérgicas y los receptores 5-HT<sub>7</sub> de la médula después de la administración sistémica de

paracetamol produce efectos antinociceptivos y antihiperalgésicos. Sin embargo, la administración del antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> SB269970, bloquea los efectos antinociceptivos y antihiperalgésicos de paracetamol, esto hace pensar que el efecto del analgésico pudiese estar modulado por los receptores 5-HT<sub>7</sub> localizados en la médula espinal.

Por otra parte, en un estudio realizado por Godínez-Chaparro y cols. (2012) del efecto de los receptores 5-HT<sub>7</sub> sobre la alodinia y la hiperalgnesia inducida por el modelo de formalina en la rata se obtuvo que el dolor persistente causado por la prueba de formalina activa a los receptores 5-HT<sub>7</sub> los cuales contribuyen al desarrollo y mantenimiento de la alodinia y la hiperalgnesia secundaria. Yang y cols. (2013) evaluaron el papel de los receptores 5-HT<sub>7</sub> sobre la modulación descendente serotoninérgica en el modelo de dolor persistente con formalina comparándolo con el modelo de dolor inflamatorio inducido por carragenina, y concluyeron que la activación de receptores 5-HT<sub>7</sub> tuvo un efecto antinociceptivo significativo en el modelo de formalina, pero ningún efecto sobre el dolor inflamatorio inducido por carragenina, indicando diferencias en la participación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> según el tipo de dolor.

**Cuadro 2.- Receptor 5-HT<sub>7</sub> como modulador del dolor nociceptivo**

<b>AUTOR</b>	<b>MODELO ANIMAL</b>	<b>ESTÍMULO</b>	<b>TIPO DE DOLOR</b>	<b>PRUEBA CONDUCTUAL</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>
Rocha-González y cols. 2005	RATA	QUÍMICO	NOCICEPTIVO PERSISTENTE	FORMALINA	El receptor 5-HT <sub>7</sub> desarrolla un papel pronociceptivo en el asta dorsal de la médula espinal.
Dogrul y Seyrek, 2006	RATÓN	FÍSICO	NOCICEPTIVO AGUDO	TAIL FLICK	Los receptores 5-HT <sub>7</sub> tiene un efecto antinociceptivo, la administración sistémica de la morfina resulta en un efecto sinérgico.
Brenchat y cols. 2009	RATÓN	FÍSICO	NOCICEPTIVO AGUDO	TAIL FLICK	Los receptores 5-HT <sub>7</sub> participan en los mecanismos antinociceptivos.
Brenchat y cols. 2011	RATÓN	FÍSICO	NOCICEPTIVO AGUDO	HOT PLATE TAIL FLICK	La administración sistémica de un agonista selectivo del receptor 5-HT <sub>7</sub> por sí solo no es suficiente para tener efectos antinociceptivos.
Brenchat y cols. 2012	RATA	QUÍMICO	NOCICEPTIVO PERSISTENTE	CAPSAICINA	Receptores 5-HT <sub>7</sub> ejercen efectos antinociceptivos a nivel de la médula espinal y efectos pronociceptivos a nivel periférico.
Dogrul y cols. 2012	RATÓN	FÍSICO	NOCICEPTIVO AGUDO	HOT PLATE TAIL FLICK	Receptores 5-HT <sub>7</sub> generan un efecto antinociceptivo y antihiperálgico.
Godínez-Chaparro y cols. 2012	RATA	QUÍMICO	NOCICEPTIVO PERSISTENTE	FORMALINA	Los receptores 5-HT <sub>7</sub> conducen al mantenimiento de la alodinia y la hiperalgesia.
Yang y cols. 2013	RATA	QUÍMICO	NOCICEPTIVO PERSISTENTE VS INFLAMATORIO	FORMALINA VS CARRAGENINA	La activación de receptores 5-HT <sub>7</sub> tuvo un efecto antinociceptivo dependiente del tipo de dolor.

### **3.3 *Levetiracetam como fármaco antinociceptivo***

El LEV es un anticonvulsivo con propiedades analgésicas probadas. Sus efectos antinociceptivos se han demostrado en modelos animales. A continuación se describirán los estudios preclínicos y clínicos de su efecto antinociceptivo, solo o en combinación con otros fármacos.

#### **3.3.1 *Estudios preclínicos***

Micov y cols. (2010) compararon los efectos de las combinaciones de dos fármacos utilizando LEV con la combinación de ibuprofeno / aspirina / paracetamol en un modelo animal de dolor neuropático. Los autores evaluaron las respuestas nociceptivas térmicas tanto en ratones diabéticos y no diabéticos mediante la prueba de “tail flick”, concluyendo con un sinergismo entre LEV y el ibuprofeno / aspirina / paracetamol en un modelo de dolor neuropático.

Shannon y cols. (2005) compararon una amplia gama de fármacos anticonvulsivos utilizados clínicamente en un modelo de dolor persistente con la prueba de formalina, e informó que la carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina, gabapentina y etosuximida, producen efectos analgésicos estadísticamente significativos en la prueba de la formalina, mientras que la fenitoína, topiramato, zonisamida, fenobarbital, tiagabina, valproato, y LEV no lo hicieron, sugiriendo que los efectos de estos fármacos pueden deberse a mecanismos farmacológicos diferentes.

La eficacia antinociceptiva de LEV en un modelo de dolor neuropático fue evaluada mediante el uso de la prueba de “hot plate”, los resultados indicaron que

LEV induce un efecto antihiperálgico. Además, los resultados de los autores ilustran que el ratón es un buen modelo experimental para el estudio de fármacos en modelos de dolor (Ozcan y cols. 2008).

Stepanovic-Petrovic y cols. (2012) comparó los efectos antihiperálgico y antiedematoso del LEV administrado periféricamente mediante inyección local y el papel potencial de los opioides, adrenérgicos, 5-HT y receptores de GABA y sus subtipos, sus datos sugieren que LEV produce efectos antihiperálgicos y antiedematosos a nivel periférico y local. Tomic y cols. (2013) estudiaron los efectos de las combinaciones del LEV con dos fármacos analgésicos no esteroideos (ibuprofeno, celecoxib y paracetamol) junto a la cafeína en un modelo de inflamación localizada mediante la prueba de "presión en la pata" (paw pressure) cuyo objetivo fue determinar el tipo de interacción entre los fármacos. Los datos del estudio mostraron que las combinaciones de los tratamientos LEV y analgésicos no esteroideos junto con cafeína podría ser útil en un tratamiento del dolor inflamatorio.

Micov y cols. (2015) evaluaron el efecto de LEV y su mecanismo de acción, mediante la participación del sistema GABAérgico, opioidérgico, serotoninérgico y adrenérgico en un biomodelo de dolor inflamatorio, los autores reportaron que el LEV produjo un efecto antihiperálgico que es, al menos en parte, mediado por GABA, opioides, 5-HT, y los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos. Por lo tanto, la activación del sistema opioidérgico, además de la de los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico, podría indicar que el efecto analgésico del LEV depende de la interacción del sistema inhibitor descendente.

### **3.3.2 Estudios clínicos**

Falah y cols. (2012) evaluaron el efecto del LEV en pacientes con dolor neuropático central debido a la esclerosis múltiple, fue un estudio doble ciego, controlado con placebo y aleatorizado cuyo objetivo es analizar el efecto independiente del LEV y tratamientos concomitantes para el dolor neuropático. Los autores reportaron que el LEV no ejerció ningún efecto en pacientes con dolor neuropático central debido a la esclerosis múltiple. Sin embargo, Rossi y cols. (2009) informó los efectos del LEV contra el dolor neuropático central en sujetos con esclerosis múltiple en una muestra de pacientes que no responden o no toleran a los medicamentos convencionales. Sus datos sugieren que LEV se tolera bien, actuando de buena manera contra el dolor central, mejorando así la calidad de vida de los pacientes con esclerosis múltiple. La eficacia de la LEV como tratamiento profiláctico de la migraña fue comparado por Brighina y cols. (2006), los pacientes fueron tratados con LEV a una dosis de 1000 mg/día durante 6 meses y se encontraron que fue en general bien tolerado y eficaz para el tratamiento de la migraña.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El dolor es un síntoma de alta prevalencia en la mayoría de las enfermedades y es la causa principal de visita al médico (Imirizaldu y Calvo, 2009). Aunque no se disponen de valores exactos, se estima que la prevalencia del dolor es de un 25-40% en las comunidades, aumentando a un 71-88% dentro de las ciudades. Por otra parte, la población geriátrica representa el mayor número de personas con este padecimiento alcanzando el 50-80%, aumentando especialmente en el último año de vida (Álaba y Arriola, 2009). El dolor por sí mismo, interfiere en las actividades laborales, profesionales, sociales, así como en el estado de ánimo y en los periodos de sueño y vigilia del paciente, aspectos que definitivamente alteran la calidad de vida de la persona y de su entorno (Molina y cols. 2013). Esto representa una sobrecarga, no solo para el sector salud debido a la obligación asistencial y consumo de recursos sanitarios directos (visitas a especialistas, radiología simple, resonancias, fármacos, fisioterapia, etc.), sino también al sector económico y social del país debido a su repercusión de forma indirecta en el número de bajas e incapacidades laborales. Podemos darnos una idea general del panorama, cuando analizamos el total de bajas laborales producidas sólo por enfermedades del aparato locomotor (una de las causas más frecuentes de dolor crónico), la cual suponen la tercera causa más común de enfermedad en México según la OMS en el 2015.

El empleo creciente de esquemas de tratamiento agresivos para el dolor, basados en combinaciones de radio y quimioterapia concomitantes, así como escalada de dosis, hacen que el dolor constituya un problema en la práctica clínica diaria. Sin embargo, es importante tener en cuenta que en el 40% de los casos no se

alcanza un control adecuado del dolor, lo que indica que el abordaje como problema de salud prevalente, no está siendo el más eficaz (Álaba y Arriola, 2009). Hoy en día, los tratamientos para el dolor se clasifican en analgésicos primarios (Analgésicos Antitérmicos Puros, Analgésicos Antiinflamatorios-AINEs y Opioides) y analgésicos secundarios (Antidepresivos, Antiepilépticos, Corticoides, Vasodilatadores, Vasoconstrictores, Relajantes musculares) (Esteva, 2008). Sin embargo, el uso desmedido de los analgésicos primarios, sin tener en cuenta la etiología de la enfermedad constituye un desperdicio de recursos importantes para el sector salud.

Los analgésicos secundarios tienen otras indicaciones terapéuticas, pero pueden disminuir algún tipo de dolor específico, sin embargo, son muy pocos los esquemas farmacológicos que emplean estos medicamentos para controlar el dolor. El LEV es un benzodiazepina de segunda generación con un excelente perfil farmacocinético y es ampliamente utilizado como antiepiléptico, neuroprotector y recientemente se le encontraron propiedades antihiperálgicas. Asimismo, el LEV posee menos efectos adversos y de interacciones farmacológicas que otros fármacos para el manejo del dolor. Sin embargo, a la fecha no se ha esclarecido por completo su mecanismo de acción. Al dilucidar la farmacodinamia de este fármaco, se entendería cómo es que está siendo modulada la respuesta nociceptiva a nivel central, generando nuevas estrategias farmacológicas para mitigar el dolor y con ello optimizando la calidad de vida del paciente.

Es preponderante generar estudios que esclarezcan la farmacodinamia del LEV y la participación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> sobre la modulación del dolor para permitir dosificaciones, prescripciones y tratamientos adecuados, de tal manera



que se pueda prescribir en padecimientos a nivel central que cursen con algún tipo de dolor, evitando la polifarmacia y siendo más eficaces para la mejora del paciente. Así mismo, la participación de los receptores 5HT a nivel central puede dar paso a nuevos blancos y estrategias terapéuticas para evitar o reducir el desarrollo de la respuesta al dolor en pacientes controlados de manera deficiente. Creemos imperante realizar investigaciones que esclarezcan el mecanismo de acción del LEV sobre los receptores 5-HT en el tálamo y su participación en la modulación del dolor.

## 5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tiene el Levetiracetam administrado vía intragástrica en ratas sometidas al modelo de dolor persistente con formalina en la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> que se encuentran en el tálamo?

## 6. HIPÓTESIS

Sí el efecto antinociceptivo del Levetiracetam administrado vía intragástrica en ratas sometidas al modelo de dolor persistente con formalina es modulado a través de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> que se encuentran en el tálamo, entonces, la expresión de los receptores talámicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> disminuirán o aumentarán al administrar Levetiracetam vía intragástrica en ratas sometidas al modelo de dolor persistente.

## 7. OBJETIVOS

### *7.1 Objetivo general*

Determinar la participación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en tálamo de la rata cuando se administra Levetiracetam en el modelo de formalina.

### *7.2 Objetivos específicos*

- Evaluar el efecto antinociceptivo de la administración de Levetiracetam por vía intragástrica.
- Evaluar la localización de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y/o 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo.
- Determinar la participación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en la acción antinociceptiva de Levetiracetam en el tálamo.
- Evaluar la participación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> en la acción antinociceptiva de Levetiracetam en el tálamo.

## **8. MÉTODOLOGÍA**

### ***8.1 Tipo de animales y localización.***

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 250 g sanas, las cuales se alojaron en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” (INR). Todos los animales fueron manejados con estricto apego en las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Así mismo, las ratas fueron tratadas con base en lo estipulado en la guía “Care and Use of Experimental Animals” (Can Counc Anim Care) (Olfert y cols. 1993) y debido a la naturaleza del experimento fueron acatados en todo momento los lineamientos que se encuentran en la “Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals” (Zimmermann, 1983). Todos los procedimientos fueron sometidos a la aprobación del Comité de Ética en Investigación del INR.

### ***8.2 Condiciones de alojamiento.***

Los animales fueron alojados en cajas de polipropileno con piso sólido y cama tipo virutas (Aspen Shavings®), utilizando una densidad poblacional de 0.66 m<sup>2</sup> por animal, temperatura ambiental de 22°C ± 2°C, humedad relativa promedio de 50+/- 10 %, ventilación de 20 recambios de aire/h con ciclos de iluminación de 12 h luz / 12 h de oscuridad. Se les proporcionó alimento balanceado en forma de pellet de la marca comercial Harlan Tekland Global Diets con 18% de proteína cruda, 3.5% de grasa cruda y 13% de fibra cruda todos los días durante las mañanas (8:00 am) y tardes (3:00 pm), en comederos de acero inoxidable”. Asimismo, se les proporcionó

agua potable *ad libitum* en botellas de plástico esterilizado provistos de pipetas con balines de acero inoxidable para impedir derrames accidentales.

### **8.3 *Habitación de las ratas para su manejo.***

Las ratas fueron manipuladas 30 min diarios, durante 5 días. Esta manipulación comprende la sujeción y la posición para recibir el tratamiento, así como su colocación en los redondeles de acrílico donde fue registrada la conducta dolorosa del animal.

### **8.4 *Número de animales y formación de grupos***

Para lograr los objetivos propuestos en este estudio se realizaron tres diseños experimentales diferentes, en los tres casos se realizó la prueba de formalina al 1% como parte del modelo de dolor persistente.

#### **8.4.1 *Evaluación del efecto nociceptivo del Levetiracetam***

Para evaluar el efecto nociceptivo del LEV en un modelo de dolor persistente, las ratas se dividieron en tres grupos: **GRUPO CONTROL** (n = 6), a estos animales se les administró 50 µL de formalina al 1% por vía subcutánea (sc) en la parte dorsal de la pata de la extremidad posterior derecha, según lo indica la prueba de formalina para generar el modelo de dolor persistente (la prueba de formalina será descrita más a detalle en el apartado 7.5); al **GRUPO SHAM** (n = 6) se le administró 50 µL de una solución salina en la parte dorsal de la pata posterior derecha para imitar la aplicación de formalina; y el **GRUPO LEV 300** (n = 6) el cual fue tratado con una dosis única de 300 mg/kg por vía intragástrica (i.g.) de LEV (Keppra <sup>TM</sup>, ucb L059,

(S) - $\alpha$ -etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a través de un cánula especial para roedores (aguja de sonda 22 g con una aguja con punta de bola para prevenir el daño del esófago y evitar que pase a través de la abertura glotal en la tráquea), 40 min después se le administro 50  $\mu$ L de una solución de formalina al 1% en la parte dorsal de la pata de la extremidad posterior derecha para evaluar la conducta dolorosa, según los parámetros que indica la prueba (**Figura 6**).



**Figura 6.-** Línea del tiempo de la evaluación del efecto nociceptivo del LEV.

#### **8.4.2 Evaluación de la dosis respuesta del Levetiracetam**

Treinta y seis ratas Wistar fueron utilizadas para evaluar la dosis respuesta del LEV, las ratas se dividieron en los siguientes seis grupos: **GRUPO CONTROL** (n = 6) se administraron 50 µL de formalina al 1% por vía subcutánea (s.c.) en la parte dorsal de la pata de la extremidad posterior derecha; al **GRUPO SHAM** (n = 6) se le administró 50 µL de una solución salina en la parte dorsal de la pata de la extremidad posterior derecha para imitar la aplicación de formalina; al **GRUPO LEV 50** (n = 6) se le administró una dosis única baja de LEV (Kepra™, ucb L059, (S) -α-etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a 50 mg/kg por vía intragástrica (i.g.) a través de un cánula especial para roedores, 40 min después se le administró 50 µL de una solución de formalina al 1% en la parte dorsal de la pata posterior derecha para evaluar la conducta dolorosa; al **GRUPO LEV 100** (n = 6) se le administro una dosis única de LEV (Kepra™, ucb L059, (S) -α-etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a 100 mg/kg i.g. a través de un cánula especial para roedores, 40 min después se le administró 50 µL de una solución de formalina al 1% en la parte dorsal de la pata posterior derecha para evaluar la conducta dolorosa; al **GRUPO LEV 200** (n = 6) se le administró una dosis única de LEV (Kepra™, ucb L059, (S) -α-etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a 200 mg/kg i.g. a través de una cánula especial para roedores, 40 min después se le administró 50 µL de una solución de formalina al 1% en la parte dorsal de la pata posterior derecha para evaluar la conducta dolorosa; y al **GRUPO LEV 300** (n = 6) se le administró una dosis única alta de LEV (Kepra™, ucb L059, (S) -α-etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a 50



mg/kg i.g. a través de un cánula especial para la especie, 40 min después se le administró 50 µL de una solución de formalina al 1% en la parte dorsal de la pata posterior derecha para evaluar la conducta dolorosa (**Cuadro3**).

**Cuadro 3.-** Formación de grupos para la evaluación de la curva dosis respuesta del LEV

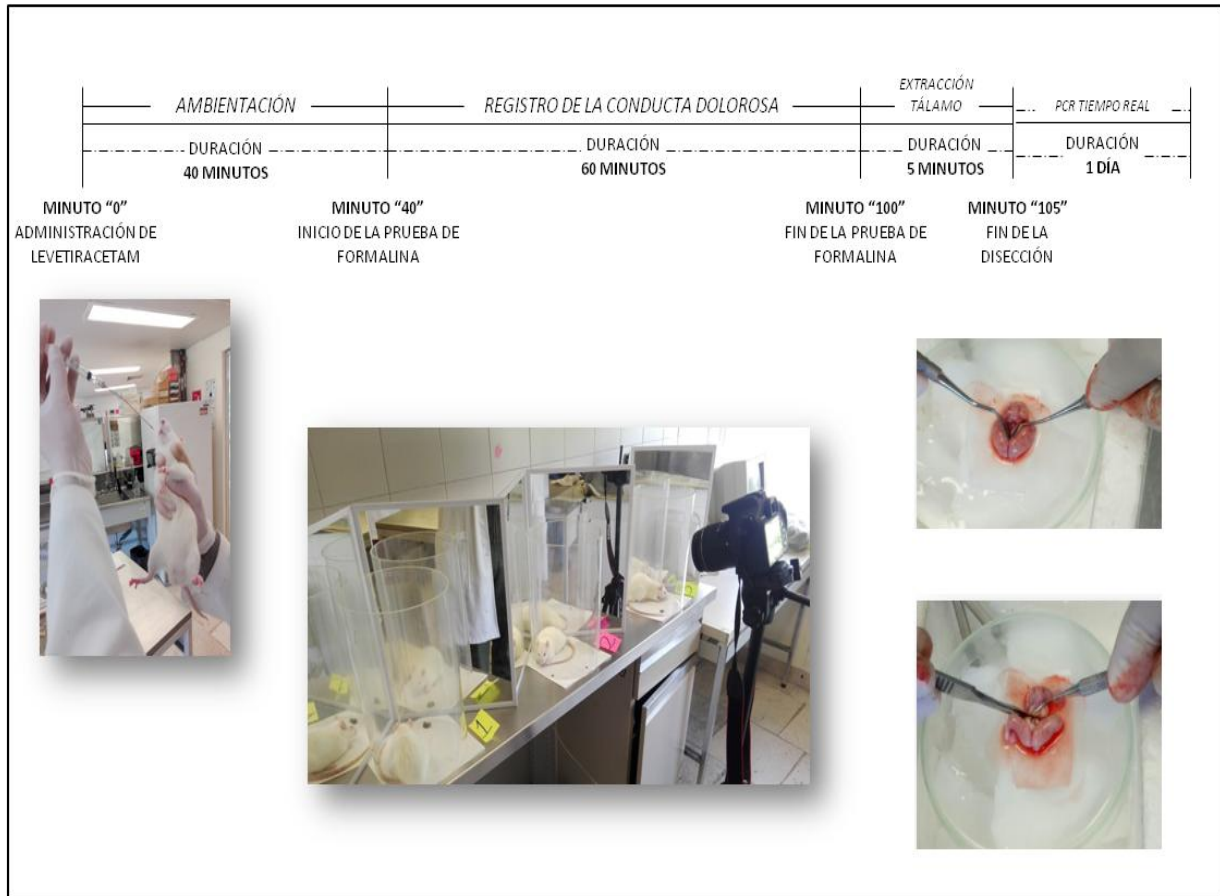
<b>GRUPO</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PRUEBA DE FORMALINA</b>
<i>GRUPO CONTROL</i>	<i>SIN TRATAMIENTO</i>	<i>50 µL de formalina al 1%</i>
<i>GRUPO SHAM</i>	<i>SIN TRATAMIENTO</i>	<i>50 µL de solución salina</i>
<i>GRUPO LEV50</i>	<i>50 mg/kg de LEV vía intragástrica</i>	<i>50 µL de formalina al 1%</i>
<i>GRUPO LEV100</i>	<i>100 mg/kg de LEV vía intragástrica</i>	<i>50 µL de formalina al 1%</i>
<i>GRUPO LEV200</i>	<i>200 mg/kg de LEV vía intragástrica</i>	<i>50 µL de formalina al 1%</i>
<i>GRUPO LEV300</i>	<i>300 mg/kg de LEV vía intragástrica</i>	<i>50 µL de formalina al 1%</i>

#### **8.4.3 Evaluación de la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub>**

Para evaluar la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> se utilizaron 36 ratas Wistar, estos animales se dividieron en los siguientes seis grupos: **GRUPO CONTROL** (n = 6) al cual solo se le realizó la extracción del tálamo (la extracción de esta estructura será descrita más a detalle en el apartado 7.6); **GRUPO LEV 50** (n =

6) estos animales fueron tratados con una dosis única de 50 mg/kg i.g. de LEV (Keppra <sup>TM</sup>, ucb L059, (S) - $\alpha$ -etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a través de un cánula especial para roedores, pasados 100 min se realizó la eutanasia por medio de decapitación inmediatamente después se realizó la extracción del tálamo; **GRUPO LEV 300** (n = 6) se les administró una dosis única de 300 mg/kg i.g. de LEV (Keppra <sup>TM</sup>, ucb L059, (S) - $\alpha$ -etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a través de un cánula especial para roedores, pasados 100 min se realizó la eutanasia por medio de decapitación, inmediatamente después se realizó la extracción del tálamo; **GRUPO FORMALINA** (n = 6) a estos animales solo se les realizó la prueba de formalina, que consiste en la administración de 50  $\mu$ L de formalina al 1% en la parte dorsal de la pata posterior derecha, una vez finalizada la prueba se realizó la decapitación de los animales para la extracción del tálamo; **GRUPO FORMALINA / LEV 50** (n = 6) se les administró una dosis única de 50 mg/kg i.g. de LEV (Keppra <sup>TM</sup>, ucb L059, (S) - $\alpha$ -etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a través de un cánula especial para roedores, así mismo, se les realizó la prueba de formalina que consiste en la administración de 50  $\mu$ L de formalina al 1% en la parte dorsal de la pata posterior derecha, una vez finalizada la prueba se realizó la decapitación de los animales para la extracción del tálamo; **GRUPO FORMALINA / LEV 300** (n = 6) se les administró una dosis única de 300 mg/Kg i.g. de LEV (Keppra <sup>TM</sup>, ucb L059, (S) - $\alpha$ -etil-2-oxo-pirrolidina acetamida, UCB Pharma, Torino, Italia) a través de un cánula especial para roedores, así mismo, se les realizó la prueba de formalina que consiste en la administración de 50  $\mu$ L de formalina al 1% en la parte dorsal de la pata posterior derecha, una vez finalizada la prueba se realizó la decapitación de los animales para la extracción del tálamo,

posteriormente se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de los receptores (**Figura 7**).



**Figura 7.-** Línea del tiempo de la evaluación de la administración del LEV sobre a expresión de los receptores talámicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en la prueba de formalina.

### **8.5 Prueba con formalina (Modelo de dolor persistente).**

En todos los experimentos realizados las ratas fueron sometidas al modelo de dolor persistente el cual consiste en la administración de 50 µL de formalina al 1% (s.c.) en la región dorsal de la extremidad posterior derecha (Dubuisson y Dennis, 1978). Los animales pasaron por un proceso de adaptación a la prueba el cual consiste en colocar a la rata en un redondel de observación de plexiglás (10 x 20 x

24cm) durante 40 min al día durante 3 días antes de la inyección. El día de la administración el animal tiene que pasar por un periodo de ambientación de 40 min en el redondel antes de la inyección de formalina, para la administración se utilizó una aguja calibre 26 G conectada a una jeringa de 1 mL. La formalina fue administrada rápidamente mientras la rata fue inmovilizada con un nivel de restricción moderado. Posteriormente, la rata se colocó en el redondel de observación de plexiglás con espejos posicionados en un ángulo de 45° para permitir la observación sin obstáculos de las extremidades posteriores de los animales. Una vez que la rata estaba dentro del redondel el comportamiento relacionado con el dolor se cuantificó contando el número de sacudidas de la pata en la cual se le administró la formalina, los registros de esta conducta se cuantificaron durante periodos de 1 min con un intervalo de 5 minutos entre cada uno, hasta completar los 60 minutos, así mismo, el registro quedó grabado en video para corroborar lo registrado al momento de la prueba. Todos los registros se llevaron a cabo a las 9:00 am del día.

La prueba de formalina, produce una respuesta de tipo bifásico (Wheeler-Aceto y cols. 1991), es decir una primera etapa que comprende 5-10 min y que se ha reportado que es por activación directa de formalina a los nociceptores y asemeja el dolor de tipo agudo (activación de las fibras nociceptivas aferentes de tipo C) y la segunda etapa, que inicia a los 15-20 min después de la administración de formalina y dura aproximadamente 20-40 min llegando hasta un pico máximo de conductas y después disminuye, esta fase forma parte del dolor persistente.

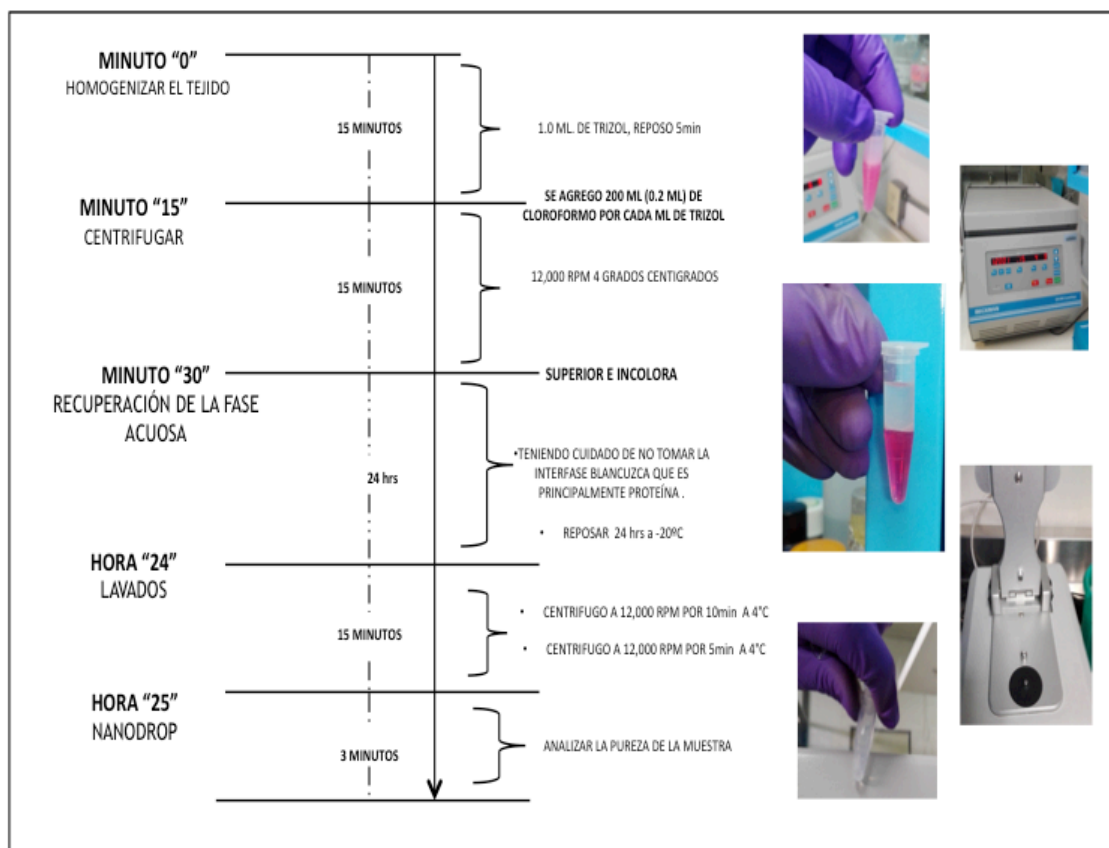
### **8.6 Extracción del Tálamo.**

Inmediatamente después de la prueba de formalina se les realizó la eutanasia a los animales por medio de decapitación, posteriormente se realizó la disección completa del cerebro de la bóveda craneal, para ello utilizamos alicatas con las cuales realizamos un corte sobre la sutura escamosa (entre el hueso temporal y hueso parietal) y de esta manera exponer el cerebro, acto seguido, fue retirado de la bóveda craneal y colocado en una plancha de cristal que se encontraba en contacto directo con dióxido de carbono en estado sólido a menos 78°C, para localizar el tálamo se retiró la corteza cerebral hasta observar el hipocampo el cual sirvió de punto de referencia, debido a que anatómicamente en nuestro biomodelo el tálamo se encuentra justo debajo de esta estructura. Una vez identificado el tálamo, este fue extirpado y colocado en tubos eppendorf de 1 mL estériles (Eppendorf PhysioCare Concept<sup>®</sup>), los cuales fueron colocados en congelación a -80°C.

### **8.7 Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR-Tiempo Real).**

El ARN total se obtuvo directamente del tálamo y las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: con la finalidad de lisar las células del tejido se agregó a cada muestra 1.0 mL de TRIzol y se homogenizó varias veces con una micropipeta, se dejó reposar el homogenizado por 5 min a temperatura ambiente, esto permitió la disociación completa del complejo de nucleoproteínas, después del reposo se agregó 200 µL (0.2 ml) de cloroformo por cada ml de TRIzol y se agitó en el vortex por 15 s, posteriormente se dejó reposar 10 min. Pasado los 10 min se

centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa (superior e incolora), y se desechó la fase orgánica (inferior y roja), teniendo cuidado de no tomar la interfase blanca (proteína). A la fase recuperada (fase acuosa) se agregó 500 µL de isopropanol (0.5 mL), por cada ml de TRIzol. Acto seguido, se dejó reposar toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, inmediatamente después se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 75%, posteriormente se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 5 min a 4°C, el siguiente paso fue secar y finalmente disolver la pastilla de RNA en Agua DEPC. La cuantificación se realizó por espectrofotometría con la finalidad de saber la concentración de la muestra, la absorbancia que utilizamos para saber la concentración es la de 260nm (**Figura 8**).



**Figura 8.-** Línea del tiempo de la extracción del RNA del tálamo.

La retrotranscripción o transcripción reversa de RNA a cDNA a DNA complementario (cDNA) se realizó con el equipo Rotor-Gene Q, (Quiagen, Frankfur, Germany) para ello se realizó una mezcla por muestra de 1 µL de RNA del tejido (tálamo), 1 µL QuantiTec Rev. Transcription Kit (Quiagen, Frankfur, Germany) y 4 µL de amortiguador. Las condiciones del equipo fueron las siguientes: 42°C por 5 min para descontaminar, consecutivamente para la retrotranscripción el equipo fue programado a 42°C durante 15 min, he inmediatamente después a 95°C durante 3 min.

El RT-PCR en tiempo real se realizó usando el equipo Rotor-Gene Q (Quiagen, Frankfur, Germany), 20 µL de cDNA de cada muestra fueron colocados en el equipo para la detección de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub>. Para el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, las muestras consistían en 10 µL RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix Kit (Quiagen), 2 µL del Primer 5-HT<sub>1A</sub> forward, 2 µL del Primer 5-HT<sub>1A</sub> reverse (**Cuadro 4**), 4 µL de H<sub>2</sub>O y por último 2 µL de cDNA. En el caso del receptor 5-HT<sub>7</sub>, las muestras consistieron en 10 µL RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix Kit (Quiagen), 2 µL del Primer 5-HT<sub>7</sub> forward, 2 µL del Primer 5-HT<sub>7</sub> reverse (**Cuadro 4**), 4 µL de H<sub>2</sub>O y por último 2 µL de cDNA.

**Cuadro 4.-** Secuencias del los cebadores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> utilizados en este estudio.

PRIMER	FORWARD	REVERSE
5-HT <sub>1A</sub>	TGCTCATGCTGGTTCTCTAC	GTCCGTTTCAGGCTCTTCTT
5-HT <sub>7</sub>	TCTTCAAGCGGGAACAGAAA	CAGGAGGTGCCACAGATAAA

Las condiciones del equipo fueron las siguientes: para la activación del primer el equipo se programó a 95°C durante 10 min, para la fase de desnaturalización el equipo fue programado a 95°C durante 15 s, y por último la fase de alineación se llevó a cabo a 55°C durante 60 s por ciclo con un total de 45 ciclos. 45 reacciones de RT-PCR tiempo real fueron las que se realizaron para este estudio.

### ***8.8 Análisis estadístico.***

En todos los casos se realizó las pruebas de normalidad, para el análisis correspondiente a las fases conductuales se realizó un ANOVA de una vía y una prueba Post Hoc de Tukey. Los datos obtenidos fueron expresados con las medias  $\pm$  error estándar. En todos los casos, los niveles de significancia se establecieron con una  $*p \leq 0.05$ . La estadística descriptiva y la estadística inferencia se realizaron con el programa de Statistical Analysis PRISMA VERSION 6 para Macintosh.



## 9. RESULTADOS

### 9.1 Efecto nociceptivo del Levetiracetam

El **Cuadro 5** muestra los resultados del número de sacudidas causadas por la prueba de formalina durante 60 min de duración de la prueba. En la primera tapa de la prueba de formalina, es decir del minuto cero al minuto diez, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo LEV y el grupo CONTROL. Sin embargo, en la segunda fase de la prueba se encontraron diferencias significativas en los primeros minutos con una disminución de sacudidas (flinches) en el grupo LEV en comparación al grupo CONTROL en un 54%; al minuto 15 ( $p < 0.03$ ), 20 ( $p < 0.001$ ), 25 ( $p < 0.02$ ), 30 ( $p < 0.02$ ) y 35 ( $p < 0.01$ ). Después del minuto 40 no se registraron diferencias entre el grupo LEV y el grupo CONTROL. Además, el análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre el grupo de SHAM en comparación a los otros dos grupos (grupo CONTROL y grupo LEV), debido que a partir del minuto 20 no se registró ninguna conducta dolorosa.

La **Gráfica 1** muestra la curva típica en la prueba de formalina, en el eje de las abscisas se muestran los minutos registrados, en tanto, en el eje de las ordenadas el número promedio de sacudidas observadas por grupo. Podemos distinguir la misma tendencia del grupo LEV al cual se le administró vía i.g. 300 mg/kg de LEV en comparación con el grupo control durante la primera fase de la prueba de formalina, sin embargo, durante la segunda etapa no se presenta la curva típica en el grupo LEV, este es un efecto presumiblemente ocasionado por el fármaco, el cual disminuye la conducta dolorosa del animal durante la segunda fase de la prueba.

Para el grupo Sham al cual se le inyectó solución salina en lugar de formalina, se puede observar que el dolor causado por la inyección tiene un efecto doloroso durante los primeros 10 min.

**Cuadro 5. – Efecto del Levetiracetam en la prueba de formalina**

TIEMPO (min)	GRUPO CONTROL	GRUPO LEV 300 mg/kg	GRUPO SHAM
	Número de sacudidas de la extremidad posterior derecha ± EE		
0	30 ± 4.3	26.8 ± 3.1	12.3 ± 2.4°
5	6.2 ± 2.1	9.5 ± 1.5	1.2 ± 0.6°
10	7.0 ± 2.5	8.8 ± 2.3	0.2 ± 0.2°
15	17.2 ± 3.6	8.6 ± 2.5 <sup>d</sup>	0.2 ± 0.2°
20	18.5 ± 2.2	7.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0°
25	16.8 ± 3.8	7.3 ± 1.5 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0°
30	12.8 ± 2.2	7.7 ± 0.7 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0°
35	10.3 ± 2.0	5.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0°
40	6.8 ± 2.0	6.0 ± 1.3	0.0 ± 0.0°
45	6.7 ± 1.9	6.2 ± 0.9	0.0 ± 0.0°
50	4.8 ± 1.5	5.3 ± 1.0	0.0 ± 0.0°
55	3.7 ± 0.7	4.8 ± 1.8	0.0 ± 0.0°
60	2.2 ± 0.5	2.3 ± 1.0	0.0 ± 0.0°

Los datos son expresados como media ±Error Estándar (EE).

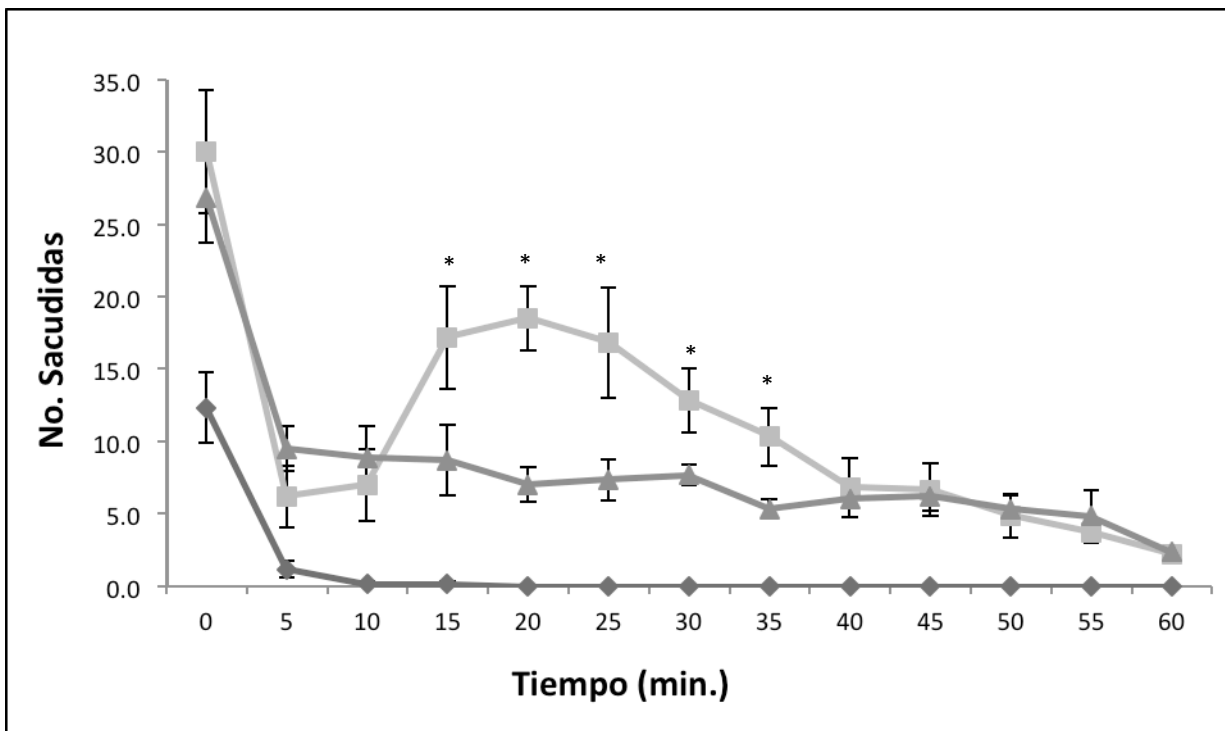
<sup>a</sup>  $p = 0.001$ , Control vs grupo LEV

<sup>b</sup>  $p = 0.01$ , Control vs grupo LEV

<sup>c</sup>  $p = 0.02$ , Control vs grupo LEV

<sup>d</sup>  $p = 0.03$ , Control vs grupo LEV

<sup>°</sup>  $p = 0.001$ , SHAM vs grupo LEV y grupo Control



**Gráfica 1.- Efecto del Levetiracetam intragástrico en la prueba de formalina.** La gráfica está construida con base en número de sacudidas en función al tiempo. (■ = grupo Control, ▲ = grupo de LEV y el ◆ = grupo Shamp). Se encontraron diferencias significativas (\*) para los minutos: 15 ( $p < 0.03$ ), 20 ( $p < 0.001$ ), 25 ( $p < 0.02$ ), 30 ( $p < 0.02$ ) y 35 ( $p < 0.01$ ) entre el grupo control vs el grupo LEV. Los datos son expresados como media  $\pm$  Error Estándar (EE).

### 9.2 Dosis respuesta del Levetiracetam

El **Cuadro 6** muestra los resultados del número de sacudidas causadas por la prueba de formalina durante los 60 min que dura la prueba en los seis grupos. Se observaron diferencias significativas al comparar el grupo de LEV de 300 mg/kg vs el grupo control; en los minutos 20 ( $p = 0.002$ ), 25 ( $p = 0.05$ ), 30 ( $p = 0.03$ ) y 35 ( $p = 0.05$ ). Al comparar el grupo LEV de 300 mg/kg vs grupo LEV de 200 mg/kg, se registraron diferencias estadísticamente significativas a los 15 minutos ( $p = 0.04$ ), 20 minutos ( $p = 0.04$ ) y 25 minutos ( $p = 0.04$ ) Mientras que la comparación del grupo LEV de 300 mg/kg vs el grupo LEV 100 mg/kg mostró diferencias significativas a partir del minuto 15 ( $p = 0.05$ ) y al minuto 20 ( $p = 0.005$ ), y una diferencia altamente

significativa al minuto 25 ( $p = 0.001$ ), esta diferencia altamente significativa se mantuvo al minuto 30 ( $p = 0.001$ ), al 35 ( $p = 0.01$ ), y finalmente, a los 40 min ( $p = 0.04$ ). La comparación del grupo LEV de 300 mg/kg vs al grupo LEV de 50 mg/kg registró diferencias altamente significativas a los minutos 15 ( $p = 0.005$ ), 20 ( $p < 0.001$ ), 25 ( $p < 0.001$ ), 30 ( $p < 0.001$ ), 40 ( $p < 0.001$ ), 50 ( $p = 0.03$ ) y 60 ( $p < 0.001$ ). Se encontraron diferencias significativas durante la mayoría de los minutos de la prueba ( $p < 0.01$ ) al comparar el grupo LEV de 300 mg/kg vs al grupo de Sham; Los minutos que no mostraron diferencias significativas fueron el minuto 5 y el minuto 60. En contraste, no se encontraron diferencias significativas durante todos los minutos de la prueba cuando se comparó el grupo Control con el grupo LEV de 200 mg/kg, este mismo fenómeno se presentó cuando comparamos el grupo LEV de 50 mg/kg vs al grupo LEV de 100 mg/kg. Por otra parte, se registraron diferencias significativas durante todos los minutos de la prueba de formalina cuando se comparó el grupo de Sham vs el grupo de control ( $p < 0.01$ ), así mismo en la comparación del grupo de Sham vs al grupo LEV de 100 mg/kg ( $p < 0.01$ ) y, finalmente, al comparar el grupo de Sham con el grupo LEV de 50 mg/kg ( $p < 0.01$ ). Cuando se comparó el grupo Control vs al grupo LEV de 100 mg/kg, se registraron diferencias significativas al minuto 30 ( $p \leq 0.04$ ). Las diferencias significativas registradas en la comparación del grupo LEV de 50 mg/kg vs el grupo Control se encontraron al minuto 30 ( $p = 0.02$ ), 35 ( $p \leq 0.01$ ), 40 ( $p \leq 0.01$ ), 50 ( $p \leq 0.05$ ) y 60 ( $p \leq 0.001$ ). Se encontraron diferencias estadísticas entre el grupo LEV de 200 mg/kg vs el grupo LEV de 100 mg/kg durante el minuto 30 ( $p \leq 0.03$ ), 40 ( $p \leq 0.03$ ), 55 ( $p \leq 0.05$ ) y 60 ( $p \leq 0.001$ ). La comparación del grupo LEV de 200 mg/kg vs al grupo LEV de 50 mg/kg registró diferencias significativas a los minutos 20 ( $p \leq 0.01$ ), 30 ( $p \leq 0.01$ ), 35 ( $p \leq 0.01$ ), 40 ( $p \leq 0.002$ ), y 45 ( $p \leq 0.05$ ). Se

observaron diferencias significativas entre el grupo LEV de 200 mg/kg vs el grupo Sham en la mayoría de los minutos de la prueba de formalina ( $p \leq 0.01$ ), los minutos que no informaron diferencias significativas fueron en los minutos 5, 50 y 55.

**Cuadro 6.– Efecto dosis respuesta del Levetiracetam en la prueba de formalina.**

Tiempo	Control	Levetiracetam (mg/kg)				Sham
		50	100	200	300	
<b>Número de sacudidas de la extremidad posterior derecha <math>\pm</math> EE</b>						
<b>0</b>	30.0 $\pm$ 4.3	28 $\pm$ 2.8	30.7 $\pm$ 1.7	27.3 $\pm$ 3.0	26.8 $\pm$ 3.1	12.3 $\pm$ 2.4°
<b>5</b>	6.2 $\pm$ 2.1	13 $\pm$ 2.9	9.7 $\pm$ 2.7	6.2 $\pm$ 2.3	9.5 $\pm$ 1.5	1.2 $\pm$ 0.6°
<b>10</b>	7.0 $\pm$ 2.5	9.5 $\pm$ 1.8	11.3 $\pm$ 3.2	10.3 $\pm$ 2.1	8.8 $\pm$ 2.3	0.2 $\pm$ 0.2°
<b>15</b>	17.2 $\pm$ 3.6	20.3 $\pm$ 2.2	16.7 $\pm$ 2.7	15.8 $\pm$ 1.9	8.7 $\pm$ 2.5 <sup>bcd</sup>	0.2 $\pm$ 0.2°
<b>20</b>	18.5 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	22.2 $\pm$ 1.3	18.0 $\pm$ 3.2	13.8 $\pm$ 2.2 <sup>g</sup>	7.0 $\pm$ 1.2 <sup>bcd</sup>	0.0 $\pm$ 0.0°
<b>25</b>	16.8 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	20.7 $\pm$ 1.6	19.2 $\pm$ 2.2	15.5 $\pm$ 2.2	7.3 $\pm$ 1.5 <sup>bcd</sup>	0.0 $\pm$ 0.0°
<b>30</b>	12.8 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	20.7 $\pm$ 1.7 <sup>e</sup>	20.0 $\pm$ 2.2 <sup>h</sup>	11.8 $\pm$ 2.5 <sup>fg</sup>	7.7 $\pm$ 0.7 <sup>cd</sup>	0.0 $\pm$ 0.0°
<b>35</b>	10.3 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	19.5 $\pm$ 2.0 <sup>e</sup>	16.7 $\pm$ 3.2	9.5 $\pm$ 2.6 <sup>g</sup>	5.3 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.0°
<b>40</b>	6.8 $\pm$ 2.0	15.5 $\pm$ 1.8 <sup>e</sup>	13.3 $\pm$ 2.7	5.7 $\pm$ 1.5 <sup>fg</sup>	6.0 $\pm$ 1.3 <sup>cd</sup>	0.0 $\pm$ 0.0°
<b>45</b>	6.7 $\pm$ 1.9	11.3 $\pm$ 2.4	8.2 $\pm$ 2.1	5.3 $\pm$ 1.1 <sup>g</sup>	6.2 $\pm$ 0.9 <sup>d</sup>	0.0 $\pm$ 0.0°
<b>50</b>	4.8 $\pm$ 1.5	8.5 $\pm$ 2.7 <sup>e</sup>	8.0 $\pm$ 1.2	6.0 $\pm$ 2.6	5.3 $\pm$ 1.0	0.0 $\pm$ 0.0°
<b>55</b>	3.7 $\pm$ 0.7	8.2 $\pm$ 2.7	8.2 $\pm$ 2.5	1.7 $\pm$ 1.1 <sup>f</sup>	4.8 $\pm$ 1.8	0.0 $\pm$ 0.0°
<b>60</b>	2.2 $\pm$ 0.5	9.3 $\pm$ 4.8 <sup>e</sup>	5.0 $\pm$ 6.8	2.7 $\pm$ 0.4 <sup>f</sup>	2.3 $\pm$ 1.0 <sup>d</sup>	0.0 $\pm$ 0.0°

Los datos son expresados como media  $\pm$  Error Estándar (EE).

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$ , Grupo control vs Grupo LEV300

<sup>b</sup>  $p \leq 0.04$ , Grupo LEV300 vs Grupo LEV200

<sup>c</sup>  $p \leq 0.05$ , Grupo LEV300 vs Grupo LEV100

<sup>d</sup>  $p \leq 0.03$ , Grupo LEV300 vs Grupo LEV50

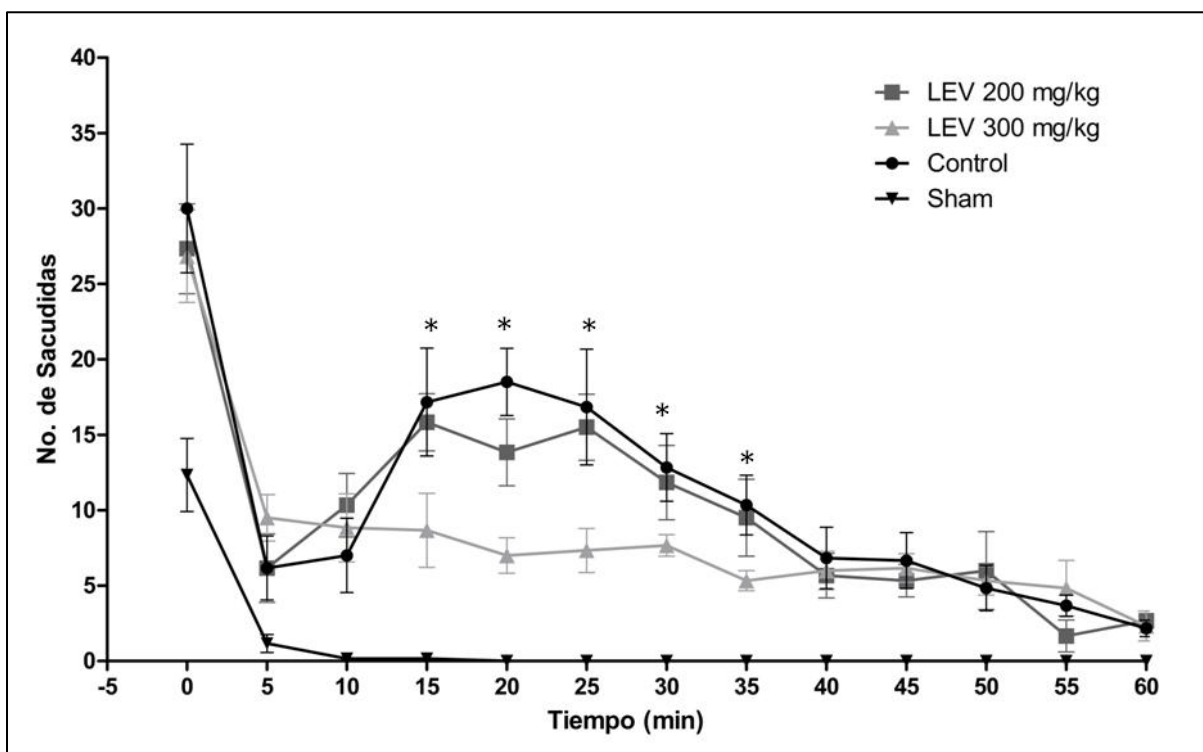
<sup>e</sup>  $p \leq 0.02$ , Grupo LEV50 vs Grupo control

<sup>f</sup>  $p \leq 0.05$ , Grupo LEV200 vs Grupo LEV100

<sup>g</sup>  $p \leq 0.01$ , Grupo LEV200 vs Grupo LEV50,

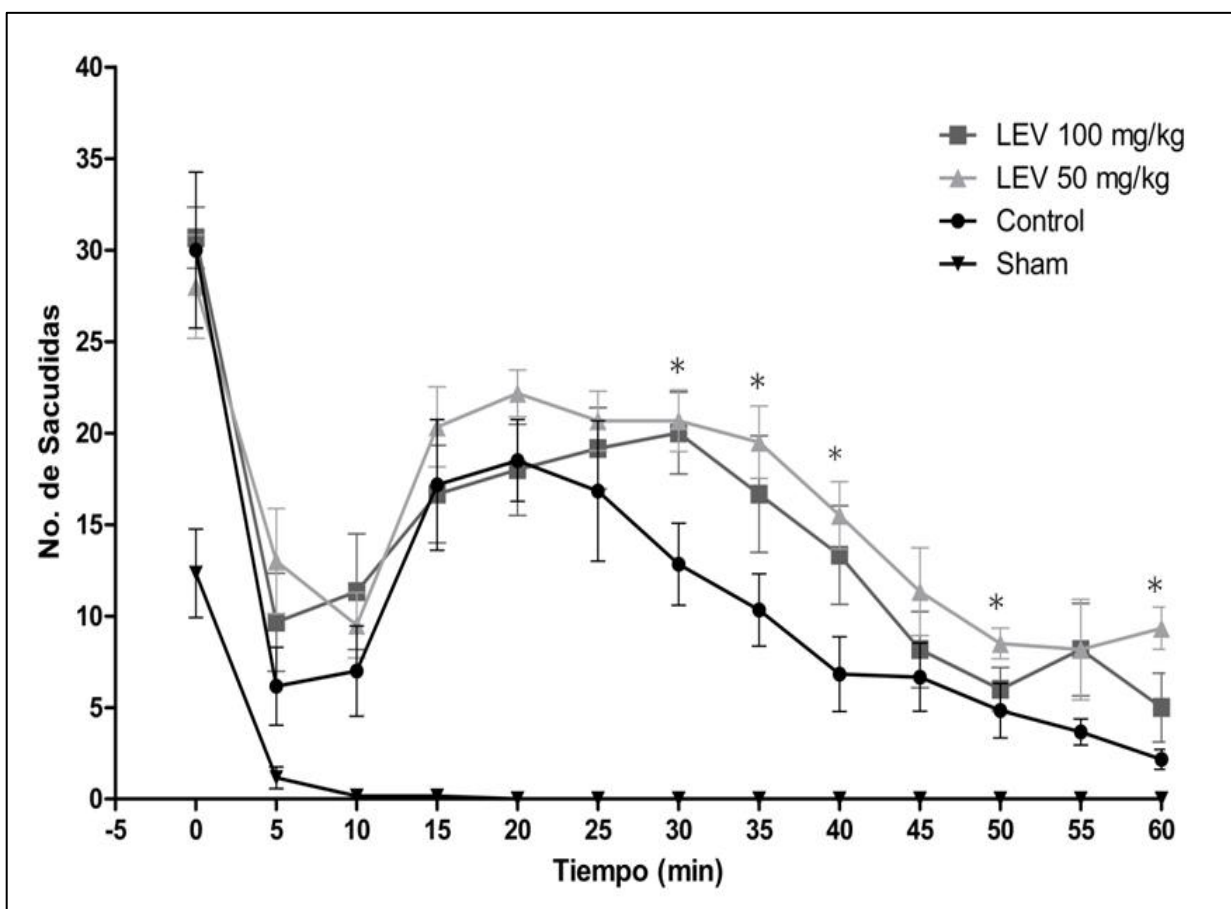
- <sup>h</sup>  $p \leq 0.01$  Grupo LEV100 vs Grupo control
- <sup>o</sup>  $p \leq 0.001$ , Grupo SHAM vs los demás Grupos

En la **Gráfica 2** muestra la tendencia antinociceptiva de dosis altas de LEV (300 mg/kg y 200 mg/kg), las diferencias encontradas al comparar la dosis de 300 mg/kg de LEV con el grupo control, se registraron a los minutos: 20 ( $p = 0.002$ ), 25 ( $p = 0.05$ ), 30 ( $p = 0.03$ ) y 35 ( $p = 0.05$ ). Al comparar el grupo LEV de 300 mg/kg en contra el grupo LEV de 200 mg/kg, se registraron diferencias estadísticas significativas a los 15 min ( $p = 0.04$ ), 20 min ( $p = 0.04$ ) y 25 min ( $p = 0.04$ ). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas al comparar el grupo 200 mg/kg de LEV con el grupo control.



**Gráfica 2- Efecto del Levetiracetam intragástrico a dosis altas en la prueba de formalina.** La gráfica está construida con base en número de sacudidas en función al tiempo. Se encontraron diferencias significativas (\*) para los minutos: 15, 20, 25, 30 y 35 ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control vs grupo LEV 300. Los datos son expresados como media  $\pm$  Error Estándar (EE).

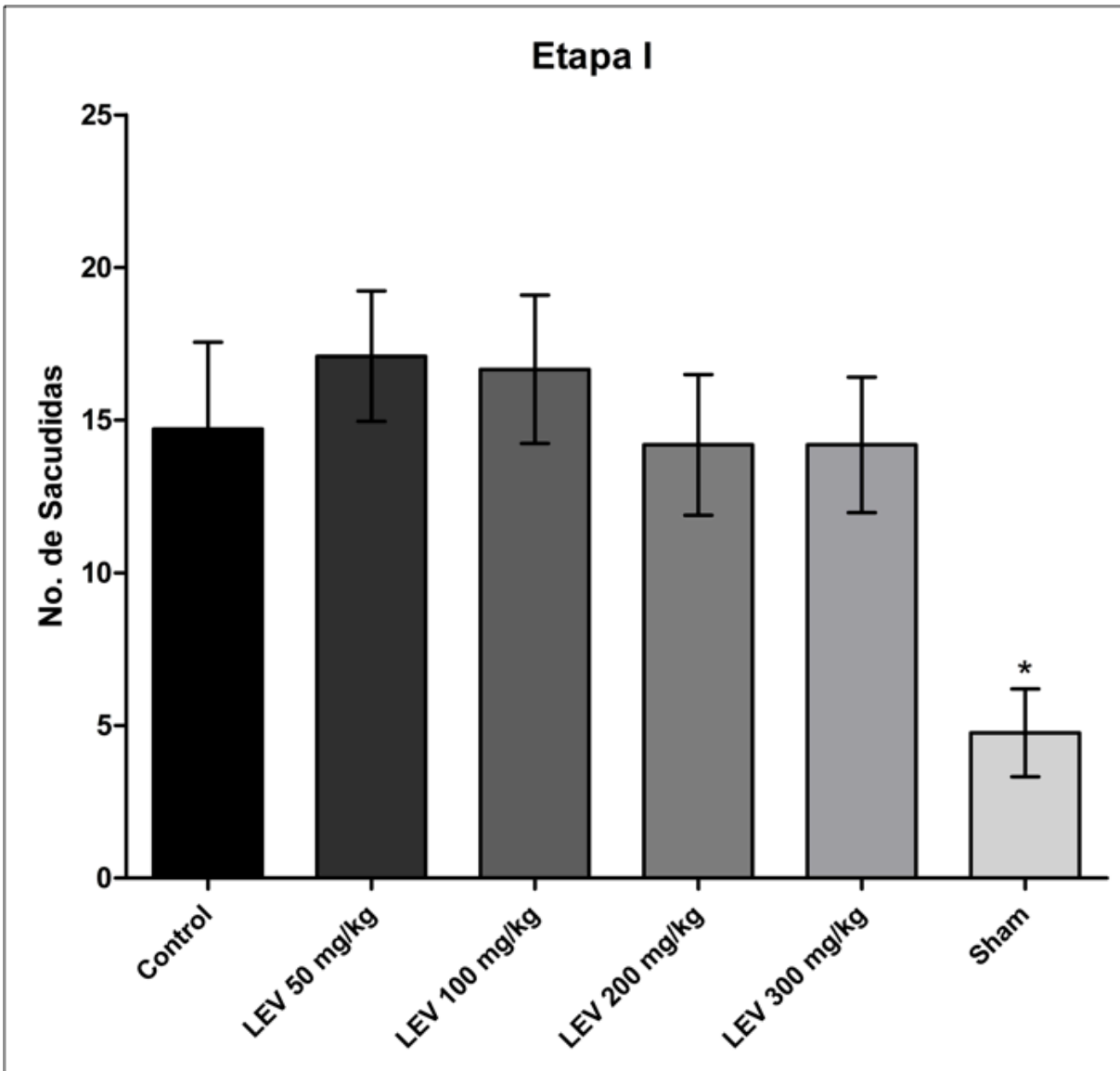
Sin embargo, en la **Gráfica 3** observamos el efecto pronociceptivo de LEV a dosis bajas, dosis de 50 mg/kg de LEV i.g. aumentan la percepción del dolor a partir del minuto 15, las diferencias significativas con respecto al control las encontramos a partir del minuto 30 ( $p = 0.02$ ), 35 ( $p = 0.01$ ), 40 ( $p = 0.01$ ), 50 ( $p = 0.05$ ) y 60 ( $p = 0.001$ ). La dosis de 100 mg/kg de LEV i.g. aumenta la sensación dolorosa con respecto al control solo al minuto 30 ( $p = 0.04$ ).



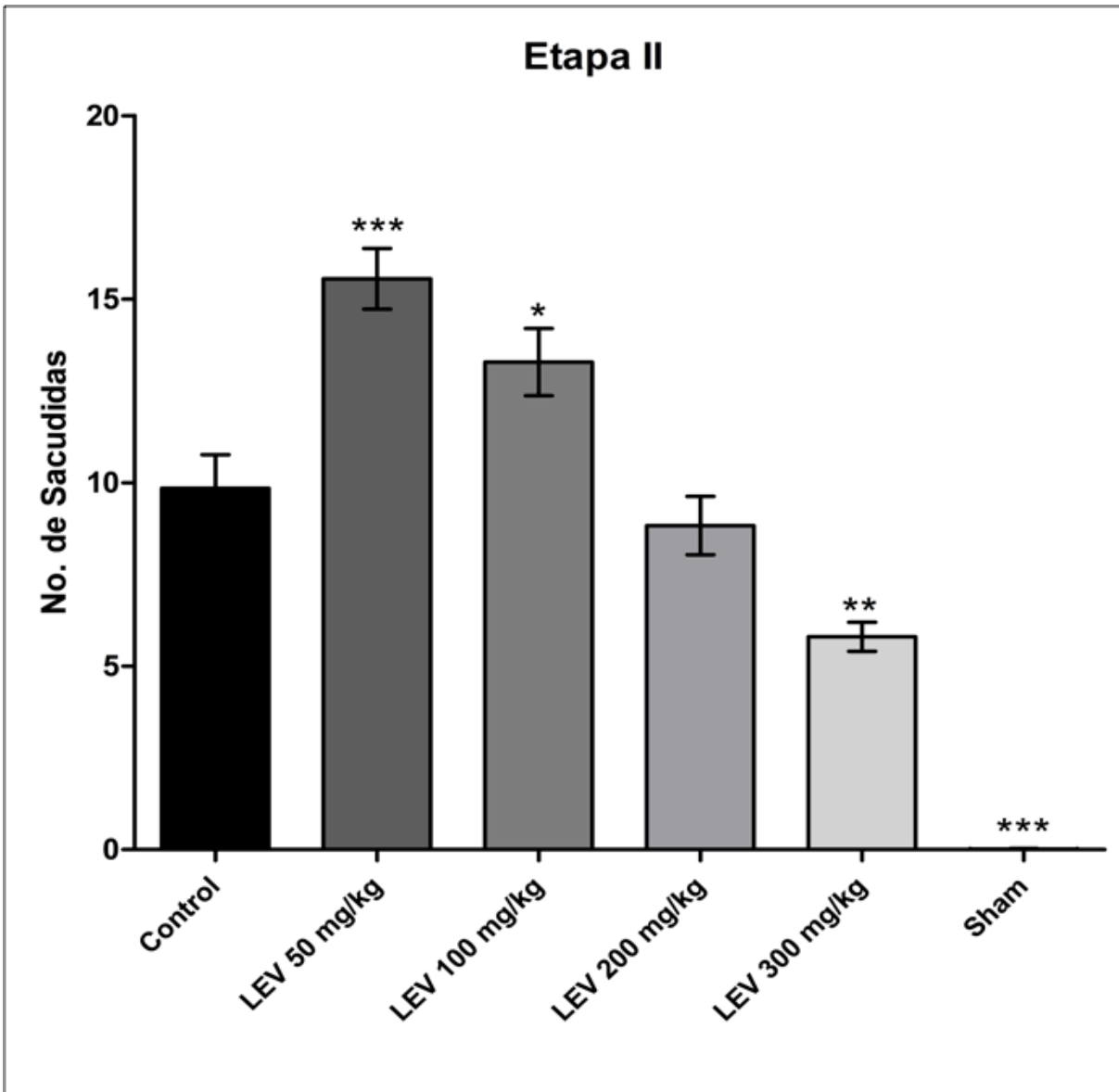
**Gráfica 3- Efecto del Levetiracetam intragástrico a dosis bajas en la prueba de formalina.** La gráfica está construida con base al número de sacudidas en función al tiempo. Se encontraron diferencias significativas (\*) para los minutos: 30, 35, 40, 50 y 60 ( $p < 0.05$ ). Los datos son expresados como media  $\pm$  Error Estándar (EE).

El número total de sacudidas de los seis animales por grupo fueron contabilizados por etapa en los seis grupos: en la etapa 1 del grupo de control, se contaron un total de 259 sacudidas, para el grupo LEV de 300 mg/kg, se registraron 271 sacudidas, para el grupo LEV de 200 mg/kg, se registraron 263 sacudidas, para el grupo LEV de 100 mg/kg, se registraron 310 sacudidas, en tanto, el grupo LEV de 50 mg/kg, se registraron 303 sacudidas y finalmente se registraron 82 sacudidas para el grupo Sham (**Gráfica 4**). En la etapa 2, el grupo control presentó un total de 599 sacudidas, en el grupo LEV de 300 mg/kg se contaron 364 sacudidas, en el grupo LEV de 200 mg/kg se contaron 527 sacudidas, para el grupo LEV de 100 mg/kg se contaron 787 sacudidas, en el grupo LEV de 50 mg/kg se contaron 937 sacudidas y en el grupo Sham se registró 1 sacudida. Durante la etapa 2 se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo control frente al grupo LEV de 300 mg/kg ( $p = 0.05$ ), de la misma manera, se reportaron diferencias estadísticas cuando se comparó el grupo Control con el grupo LEV de 100 mg/kg ( $p \leq 0.05$ ), se encontraron diferencias altamente significativas cuando se comparó el grupo de 50 mg/kg vs grupo de Control ( $p = 0.001$ ) manteniéndose la misma tendencia al comparar el grupo de LEV de 50 mg/kg frente a 200 mg/kg ( $p = 0.001$ ). Se encontraron diferencias altamente significativas cuando comparamos el grupo LEV de 50 mg/kg vs el grupo LEV de 300 mg/kg ( $p = 0.001$ ). Se registraron diferencias significativas al comparar el grupo LEV de 300 mg/kg vs 100 mg/kg LEV ( $p = 0.001$ ), finalmente, se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo LEV de 200 mg/kg frente al grupo LEV de 100 mg /kg ( $p 0.01$ ) (**Gráfica 5**).





**Gráfica 4. Comparación del número total de sacudidas de los animales en la etapa 1.** La etapa 1 de la respuesta nociceptiva comenzó inmediatamente después de la administración de formalina y después disminuyó gradualmente durante aproximadamente 10 minutos. Se encontraron diferencias muy significativas (\*) ( $p \leq 0.001$ ) durante la etapa 1 entre todos los grupos frente al grupo Sham. Los datos se expresan como media  $\pm$  Error Estándar (EE). En tu figura solo el error estándar se vea en la parte superior



**Gráfica 5. Comparación del número total de sacudidas de los animales de la etapa 2.** La etapa 2 comenzó aproximadamente 15 minutos después de la administración de formalina y duró 1 h. Los datos se expresan como media  $\pm$  Error estándar (EE). Se encontraron diferencias muy significativas (\*\*\*) entre el grupo de LEV50 vs grupo control ( $p \leq 0.001$ ), LEV50 vs LEV200 ( $p \leq 0.001$ ), LEV50 vs LEV300 ( $p \leq 0.001$ ). Se registraron diferencias significativas (\*) al comparar: LEV100 vs control ( $p \leq 0.05$ ), LEV100 vs LEV300 ( $p \leq 0.01$ ), LEV100 vs LEV 200 ( $p \leq 0.01$ ). Finalmente, Se registraron diferencias significativas (\*\*) al comparar: LEV300 vs control ( $p \leq 0.05$ ).

### **9.3 Expresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el Tálamo.**

En este apartado expondremos los resultados de la expresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo de ratas a las cuales se les administró LEV a dosis altas (300 mg/kg i.g.) y a dosis bajas (50 mg/kg i.g.) y posteriormente fueron sometidas a la prueba de formalina. En el **Cuadro 7** observamos el promedio de sacudidas por grupo respecto al tiempo de registro en la prueba de formalina, podemos observar diferencias significativas entre el grupo formalina y el grupo LEV 50 a los minutos: 15 ( $p = 0.02$ ), 20 ( $p = 0.01$ ), altamente significativo al minuto 45 ( $p = 0.001$ ), 55 ( $p = 0.03$ ) y finalmente al minuto 60 ( $p = 0.02$ ). Cuando se comparó el grupo formalina con el grupo LEV300 se registraron diferencias altamente significativas a partir del minuto 15 ( $p = 0.01$ ), 20 ( $p = 0.001$ ), 25 ( $p = 0.01$ ), 30 ( $p < 0.001$ ), 35 ( $p = 0.03$ ) 40 ( $p = 0.02$ ) y hasta el minuto 45 ( $p = 0.005$ ). Para finalizar se comparó el grupo LEV50 vs LEV300, encontramos que existe una diferencia altamente significativa iniciando desde el minuto 5 ( $p \leq 0.01$ ), 10 ( $p \leq 0.001$ ), 15 ( $p \leq 0.001$ ), 20 ( $p \leq 0.001$ ), 25 ( $p \leq 0.001$ ), 30 ( $p \leq 0.001$ ), 35 ( $p \leq 0.001$ ), 40 ( $p \leq 0.001$ ), 45 ( $p \leq 0.001$ ), no se reportaron diferencias al minuto 50, sin embargo, se registra diferencias significativas al minuto 55 ( $p \leq 0.001$ ) y en el último minuto de la prueba ( $p \leq 0.001$ ). Podemos observar un efecto antinociceptivo en dosis altas y un efecto pronociceptivo a dosis bajas.

**Cuadro 7. – Efecto del Levetiracetam a dosis alta y a dosis baja en la prueba de formalina**

TIEMPO (min)	GRUPO FORMALINA	GRUPO LEV50 mg/kg	GRUPO LEV300 mg/kg
	Número de sacudidas de la extremidad posterior derecha ± EE		
0	34.7 ± 1.6	35.0 ± 1.7	32.8 ± 1.1
5	14 ± 2.3	11.8 ± 2.2	6.2 ± 2.3 <sup>c</sup>
10	6.7 ± 1.4	8.7 ± 1.8	6.0 ± 1.4 <sup>c</sup>
15	14.7 ± 1.7 <sup>ab</sup>	21.8 ± 2.2	3.2 ± 0.8 <sup>c</sup>
20	17 ± 1.1 <sup>ab</sup>	24.7 ± 0.6	2.5 ± 1.0 <sup>c</sup>
25	18.7 ± 2.2 <sup>b</sup>	25.7 ± 2.2	4.2 ± 1.1 <sup>c</sup>
30	24.7 ± 1.7 <sup>b</sup>	26.2 ± 1.5	3.3 ± 0.8 <sup>c</sup>
35	19 ± 1.9 <sup>b</sup>	23.2 ± 0.8	7.3 ± 1.7 <sup>c</sup>
40	16.3 ± 3.1 <sup>b</sup>	19.8 ± 0.9	5.7 ± 1.5 <sup>c</sup>
45	10.5 ± 0.8 <sup>ab</sup>	17.7 ± 0.7	5.3 ± 1.1 <sup>c</sup>
50	8.8 ± 1.5	9.7 ± 1.3	6.0 ± 2.6
55	6.2 ± 1.6 <sup>a</sup>	10.8 ± 1.2	1.7 ± 1.1 <sup>c</sup>
60	3.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	10.7 ± 1.3	2.7 ± 0.4 <sup>c</sup>

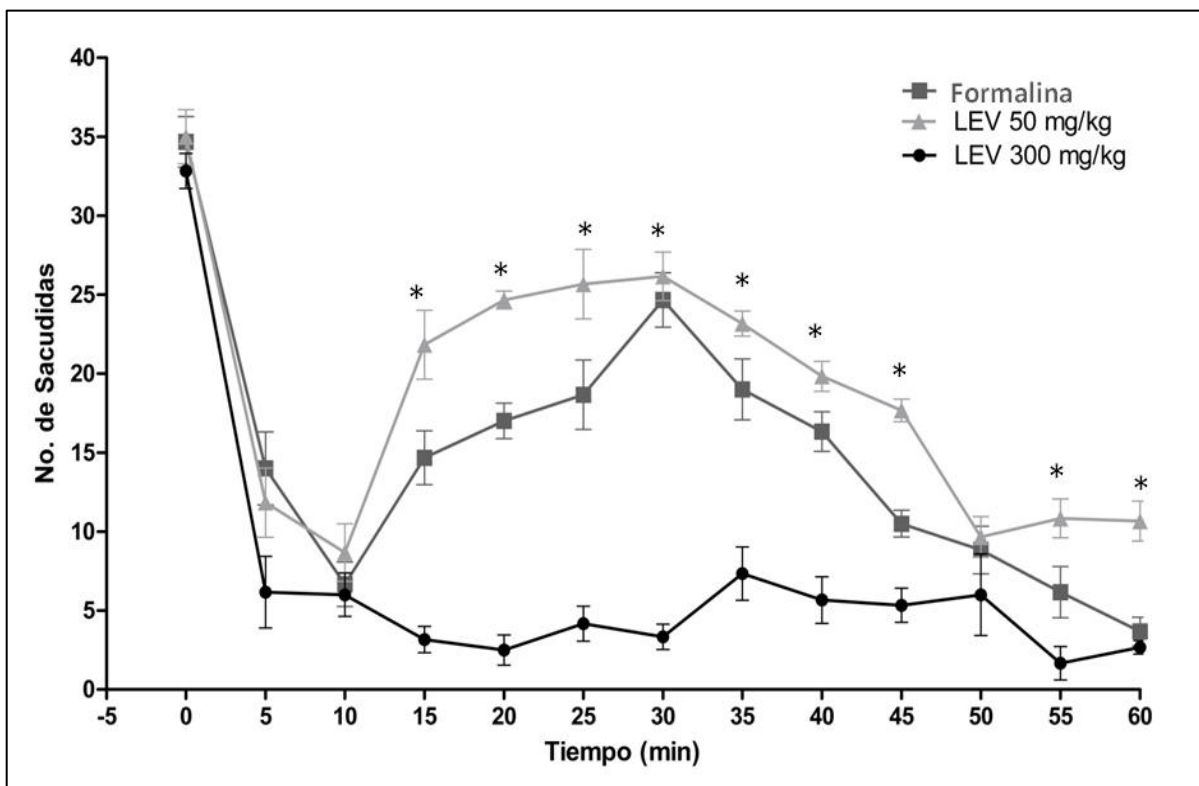
Los datos son expresados como media ±Error Estándar (EE).

<sup>a</sup>  $p \leq 0.03$ , Grupo FORMALINA vs Grupo LEV50

<sup>b</sup>  $p \leq 0.03$ , Grupo FORMALINA vs Grupo LEV300

<sup>c</sup>  $p \leq 0.05$ , Grupo LEV50 vs Grupo LEV300

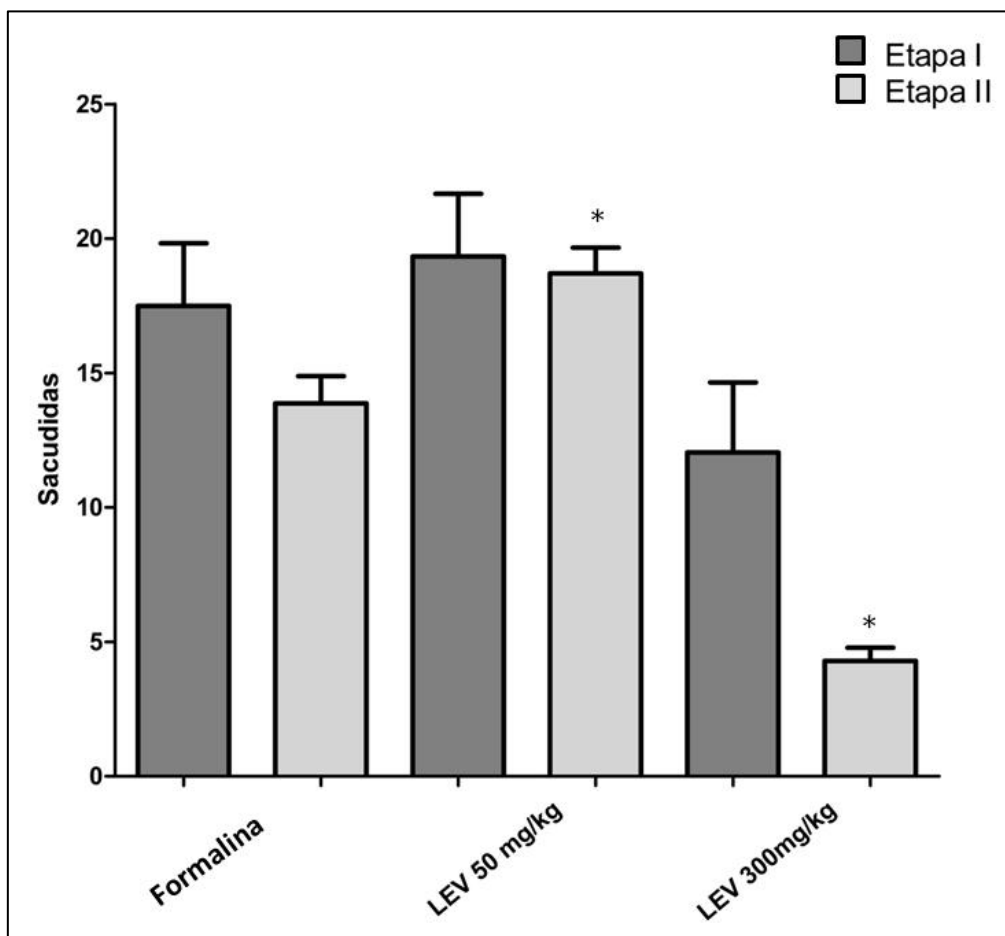
La **Gráfica 6**, muestra el efecto antinociceptivo de las ratas a las cuales se les administró dosis altas de LEV (300 mg/kg) y el efecto pronociceptivo de las ratas a las cuales se les administró dosis bajas de LEV (50 mg/kg), en la prueba de formalina.



**Gráfica 6- Efecto del Levetiracetam intragástrico a 50 mg/kg y 300 mg/kg en la prueba de formalina.** La gráfica está construida en base al número de sacudidas en función al tiempo. Se encontraron diferencias significativas (\*) para los minutos: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 60 ( $p \leq 0.05$ ) entre el grupo LEV 50 vs grupo LEV 300. El grupo formalina fue estadísticamente significativo ( $p \leq 0.03$ ) al grupo LEV50 los minutos: 15, 20, 45, 55 y 60., el grupo formalina y el grupo LEV300 registran diferencias significativas ( $p \leq 0.03$ ) los minutos 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45. Los datos son expresados como media  $\pm$  Error Estándar (EE).

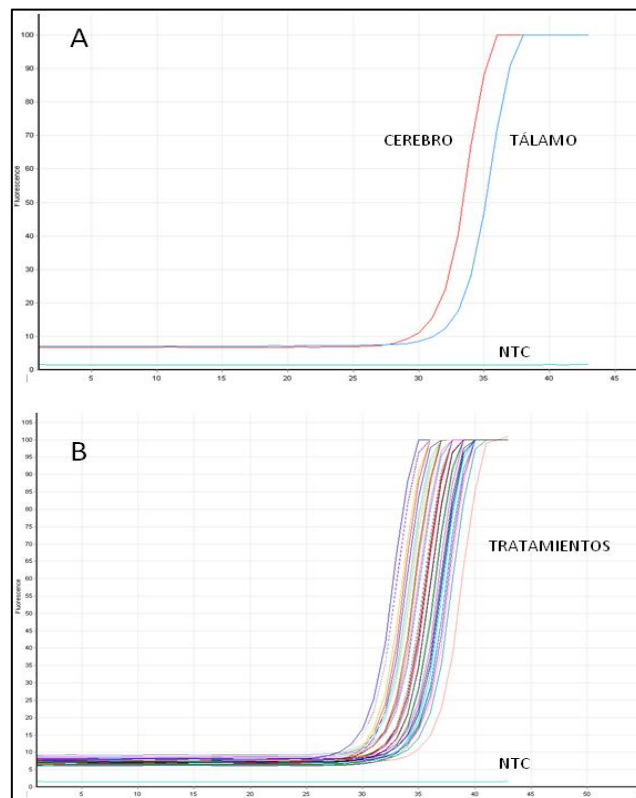
Se realizó la sumatoria total de las sacudidas registradas de todos los animales sometidos a la prueba de formalina por etapa. En la etapa 1 para el grupo formalina se registró un total de 332 sacudidas, en el grupo LEV 50 mg/kg se registraron un total de 333 sacudidas y finalmente para el grupo LEV 300 mg/kg se registraron un total de 270 sacudidas. En la primera etapa de la prueba no se encontró diferencias significativas. Para la etapa 2 se contabilizaron un total de 837 sacudidas en el grupo formalina, 1193 sacudidas en el grupo LEV 50 mg/kg y un

total de 287 sacudidas para el grupo de LEV 300 mg/kg. En esta etapa se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la comparación entre grupos (Gráfica 7)



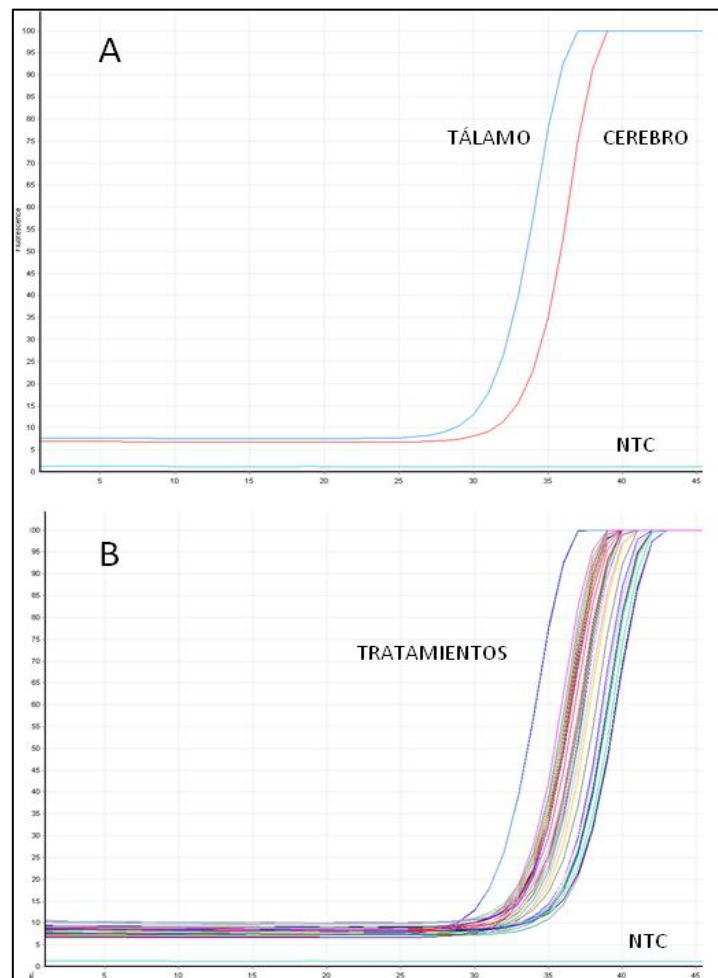
**Gráfica 7. Comparación del número total de sacudidas de los animales en la etapa I y la etapa II en la expresión de receptores 5-HT<sup>1A</sup> y 5-HT<sup>7</sup>.** La etapa 1 de la respuesta nociceptiva comenzó inmediatamente después de la administración de formalina y después disminuyó gradualmente durante aproximadamente 10 minutos. No se encontraron diferencias significativas durante la etapa 1. La etapa 2 comenzó aproximadamente 15 minutos después de la administración de formalina y duró 45 minutos. Se encontraron diferencias altamente significativas (\*) entre el grupo de formalina vs grupo LEV50 ( $p \leq 0.05$ ), formalina vs LEV300 ( $p \leq 0.05$ ), LEV50 vs LEV300 ( $p \leq 0.05$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  Error Estándar (EE).

El análisis de la expresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en tálamo, se llevó a cabo mediante RT-PCR en tiempo real, cada una de las muestras y controles fueron amplificadas por triplicado, todas las reacciones se realizaron en el Rotor-Gene Q (Quiagen, Frankfur, Germany) utilizando 2 µl de cDNA en un total de 40 ciclos. Las amplificaciones representativas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> utilizando cDNA de tálamo y cerebro pueden observarse en la **Figura 9(A)**, se logra distinguir que no hay amplificación de la muestra control llamada NTC por sus siglas en ingles (No Template Control). Para las muestras con los diferentes tratamientos podemos observar que todas amplifican excepto la muestra NTC (**Figura 9(B)**).



**Figura 9.** Amplificación del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. (A) Amplificación de receptor 5-HT<sub>1A</sub> en cerebro y tálamo de rata. (B) Amplificación de receptor 5-HT<sub>1A</sub> en tálamo de rata con los diferentes tratamientos.

En el caso del receptor 5-HT<sub>7</sub> podemos observar la amplificación tanto en cerebro como en tálamo de rata (**Figura 10(A)**), así mismo, la muestra NTC no amplificó. Las muestras de los de los diferentes tratamientos amplifican en promedio en el ciclo 35 (**Figura 10(B)**).

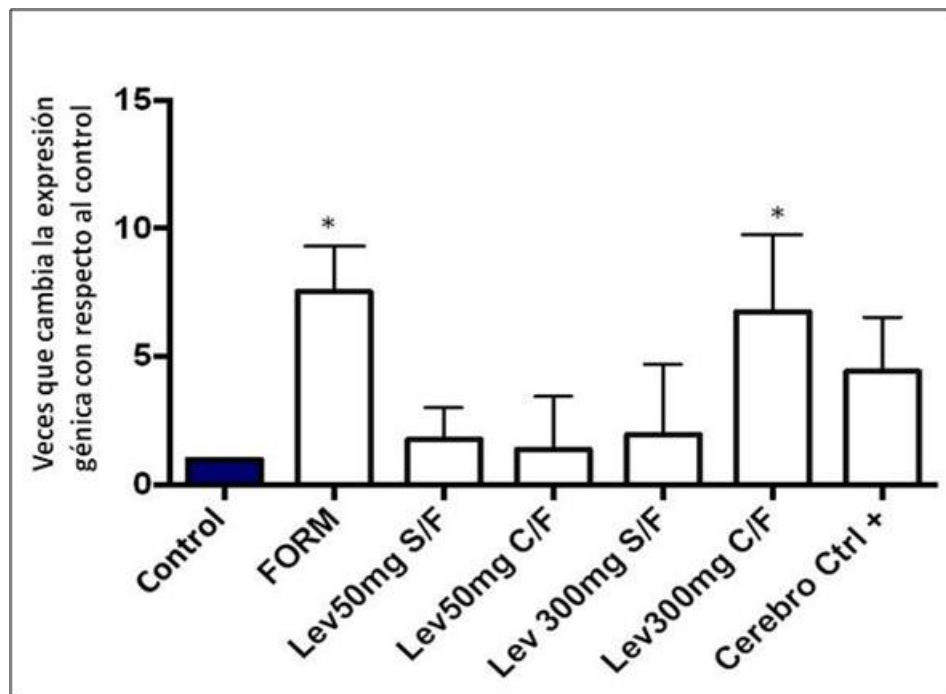


**Figura 10.** Amplificación del receptor 5-HT<sub>7</sub>. (A) Amplificación de receptor 5-HT<sub>7</sub> en cerebro y tálamo de rata. (B) Amplificación de receptor 5-HT<sub>7</sub> en tálamo de rata con los diferentes tratamientos

En la siguiente gráfica podemos observar en el eje de las “X” a los tratamientos, y en el eje de las “Y” el número de veces que cambio la expresión del gen con respecto al control. El control se encuentra de color azul del lado izquierdo y

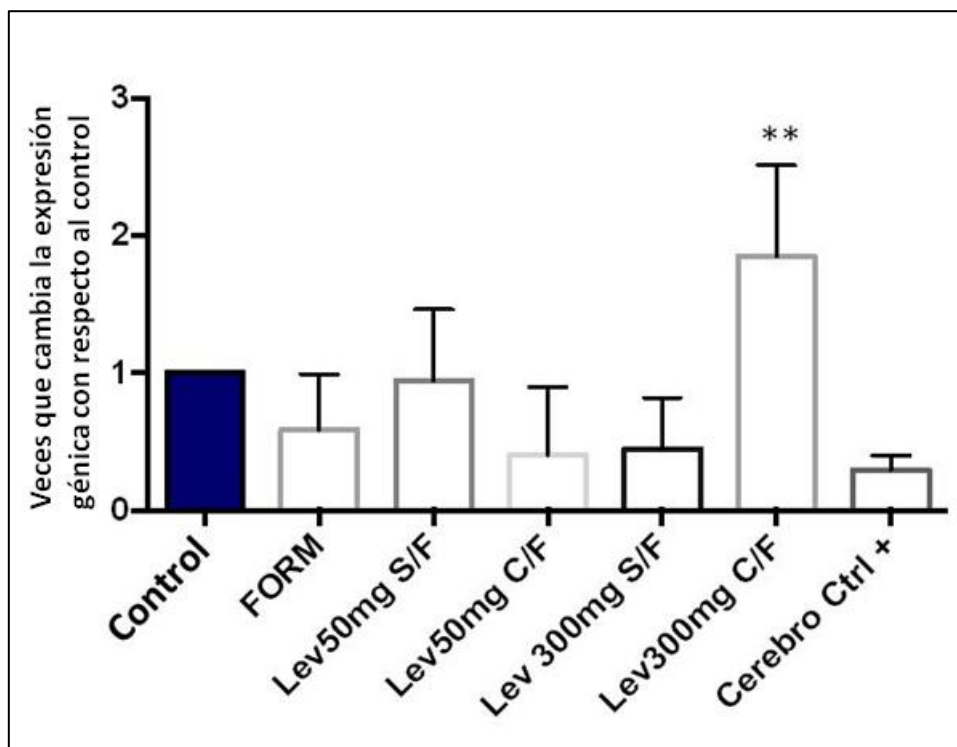


representa el 100 % de la expresión del gen. En el caso de la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> podemos observar que existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo formalina ( $p < 0.05$ ), de la misma manera se registran diferencias significativas entre el grupo control y el grupo LEV300 con formalina ( $p < 0.05$ ). El grupo formalina expuso el receptor 5-HT<sub>1A</sub> de mayor manera que los grupos FORMALINA / LEV50 ( $p < 0.05$ ), LEV50 sin formalina ( $p < 0.05$ ) y LEV300 sin formalina ( $p < 0.05$ ). Se registraron diferencias significativas entre los grupos LEV50 con formalina vs LEV300 con formalina, por último, observamos diferencias significativas cuando comparamos los grupos LEV300 con formalina vs LEV300 sin formalina ( $p < 0.05$ ) (**Gráfica 8**).



**Gráfica 8. Comparación de la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el tálamo de rata.** Se encontraron diferencias altamente significativas (\*) de los grupos de formalina y LEV300 con respecto al control y a los demás tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), no se encontraron diferencias significativas entre el control positivo en comparación al grupo formalina y al grupo LEV300. Los datos se expresan como media  $\pm$  Error estándar de la media (EE).

En el caso de la expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> podemos observar diferencias significativas cuando comparamos los grupos Control vs LEV300 con formalina ( $p \leq 0.05$ ), de la misma manera cuando se compararon los grupos formalina vs LEV300 con formalina ( $p \leq 0.05$ ), el grupo LEV50 si formalina resulto con menor expresión del receptor cuando se comparó con el grupo LEV300 con formalina ( $p \leq 0.05$ ), de la misma manera, el grupo LEV50 con formalina y grupo LEV50 sin formalina expresaron de menor manera el receptor a comparación del grupo LEV300 con formalina ( $p \leq 0.05$ ). Al comparar el grupo LEV300 con formalina vs LEV300 sin formalina se registró una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) donde la tendencia fue una mayor expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el grupo LEV300 con formalina (**Gráfica 9**).



**Gráfica 9. Comparación de la expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo de rata.** Se encontraron diferencias altamente significativas (\*\*) entre grupo LEV300 con respecto a los demás grupos ( $p < 0.05$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  Error estándar (EE).

## 10. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran el efecto antinociceptivo del Levetiracetam a dosis altas (300 mg/kg) y un efecto pronociceptivo a dosis bajas (50, 100 mg/kg) en animales sometidos al modelo de formalina, así mismo, se corroboró la presencia de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo y la participación de estos como molécula blanco del Levetiracetam para ejercer el efecto antinociceptivo.

### ***10.1 Efecto dosis respuesta del Levetiracetam***

Los resultados de este estudio revelaron tanto un efecto antinociceptivo en dosis altas de LEV (300 mg/kg) como un efecto pronociceptivo a dosis bajas de LEV de 100 mg/kg y 50 mg/kg en un modelo de dolor persistente, mientras que la dosis de 200 mg / kg de LEV no demostró diferencias con respecto al grupo de control. Sin embargo, Micov y cols. (2010) informaron el efecto antihiperálgico de LEV en ratas sometidas al modelo de dolor inflamatorio a dosis de 200 mg/kg de LEV. En nuestro estudio, no encontramos efectos antinociceptivos a esta dosis debido al modelo y la duración de la prueba, ya que los autores encontraron que los efectos antihiperálgicos se observaron a los 120 minutos de la prueba.

Benedetti y cols. (2004) realizaron un estudio en el que se investigó la farmacocinética y el metabolismo de LEV en ratones, ratas, conejos y perros después de una dosis única oral. Los autores informaron que la C<sub>max</sub> (54,7 µg / ml) de este fármaco en ratas macho se observó a los 40 minutos de administración oral a una dosis de 54 mg/kg. Este hecho es muy importante cuando se diseña la fase experimental; en este estudio esperamos 40 min después de la administración para

asegurarnos de que el fármaco estaba presente en el cerebro y para asegurar que pudiera ejercer el efecto antinociceptivo o pronociceptivo sobre el SNC. Micov y cols. (2015) propusieron que el efecto antihiperalgésico de LEV está modulado por los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos, GABAA, opioides y, finalmente, por el receptor 5-HT1.

Por otra parte, dosis bajas de 100 y 50 mg / kg (vía i.g.) de LEV han demostrado un efecto pronociceptivo hasta 100 min después de la administración i.g. A nuestro entender, este es el primer informe de dicha actividad; sin embargo, en los resultados obtenidos por Tomic y cols. (2013) en el mismo modelo de dolor inducido por formalina, el número total de cefaleas registradas en animales con una dosis de 50 mg/kg fue mayor que el del grupo Control. Aunque no hubo diferencias significativas entre estos dos grupos, los resultados obtenidos en este estudio son similares, se piensa que las diferencias pueden surgir debido a las variaciones en el modelo empleado.

La dualidad del efecto de LEV cuando es administrado vía intragástrica en ratas sometidas a la prueba de formalina observado en este estudio, nos motiva a pensar que es modulado por receptores serotoninérgicos debido a las vías de serotonina (5-HT) que ejercen una influencia inhibidora (inhibición descendente) o facilitadora (facilitación descendente) en el procesamiento espinal de la entrada nociceptiva, dependiendo de los estados de dolor agudo o crónico y del tipo de receptor (Bardin y cols. 2000; Jeong y cols. 2004; Dogrul y cols. 2009). Sin embargo, la 5-HT modula la transmisión nociceptiva espinal de una manera compleja, empleando la participación de múltiples subtipos de receptores 5-HT y su localización específica en el SNC.

## **10.2 Expresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo**

El tálamo representa el primer estadio de la vía sensorial en el cual influencias moduladoras pueden afectar el procesamiento de la información sensorial. Los resultados de este estudio corroboran la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo de rata, estos resultados son similares a lo reportado por Kia y cols. (1996) quienes encontraron la presencia del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en tálamo de rata mediante inmunohistoquímica. Así mismo, Neumaier y cols. (2001) siguiendo la misma técnica reporta la presencia del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo de rata. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> que se encuentran en el tálamo se expresaron de manera significativa en los grupos formalina y LEV300 con formalina con respecto al control en este estudio. Los receptores de la familia 5-HT<sub>1</sub> están presentes en toda la médula espinal y en la sustancia gris en todas las áreas involucradas en la nocicepción, y es la principal clase de receptor 5-HT que se encuentra en el asta dorsal (Zelman y Schwab, 1991). Eide y cols. (1990) examinaron si la administración de agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> en ratones podría alterar el reflejo de la sacudida de la cola y si los efectos sobre la latencia del reflejo implican cambios en la temperatura de la piel de la cola; los autores encontraron que en el ratón, los agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> inhiben el reflejo nociceptivo de la cola cuando se inyecta en el espacio subaracnoideo espinal, y que el efecto no depende de los cambios en la temperatura de la piel de la cola. Estos resultados coinciden con lo reportado en este estudio, debido a que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> se expresó en el grupo que conductualmente percibe menos dolor.

Por otra parte, Zhang y cols. (2001) informaron que la excitabilidad de las neuronas del cuerno dorsal y la sensibilidad de las neuronas a los agonistas del receptor 5-HT<sub>1</sub> intratecal podrían aumentar después del modelo de inflamación. Los autores utilizaron una inyección intraplantar de carragenina, que presenta un inicio rápido y una resolución de la inflamación que provoca una distribución restringida de la hiperalgesia. Estos resultados coinciden con el aumento de la expresión de los receptores en el grupo formalina al cual solo se le genero el estímulo doloroso. Sin embargo, Sasaki y cols. (2001) determinaron cuál de los subtipos de receptores de 5-HT espinales estaban involucrados en la modulación de la transmisión nociceptiva en la prueba de formalina para comprender mejor los mecanismos farmacológicos de la antinocicepción inducida por 5-HT. Sus resultados mostraron que el agonista de 5-HT<sub>2</sub> (10, 30 y 100 µg) redujo el comportamiento nociceptivo de la extremidad inyectada con formalina en ambas fases 1 y 2 de una manera dependiente de la dosis, este receptor no fue evaluado en este estudio.

La expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el tálamo aumento en el grupo LEV300 con formalina significativamente en comparación con el resto de los grupos, este efecto sugiere que los receptores 5-HT<sub>7</sub> que se encuentran en el tálamo regulan el efecto antinociceptivo del LEV. Rocha-González y cols. (2005) determinaron la participación los receptores 5-HT<sub>7</sub> sobre la respuesta nociceptiva utilizando la prueba de formalina, los resultados sugieren, un papel pronociceptivo del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el asta dorsal de la médula espinal. Sin embargo, Brenchat y cols. (2009) evaluaron el papel del receptor 5-HT<sub>7</sub> sobre la nocicepción en ratones sometidos al modelo de "tail flick". Sus resultados mostraron que los receptores 5-HT<sub>7</sub> participan en los

mecanismos antinociceptivos, por otra parte, la función de los receptores 5-HT<sub>7</sub> a nivel periférico y a nivel central sobre la modulación nociceptiva fue investigado por Brenchat y cols. (2012) los resultados muestran que la activación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> ejerce efectos antinociceptivos a nivel de la médula espinal y efectos pronociceptivos a nivel periférico. Los resultados de este estudio en cuanto la participación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> como blanco terapéutico de LEV y su efecto antinociceptivo son similares a los expuestos por Brenchat y cols. (2009; 2012), sin embargo se contraponen a lo reportado por Rocha-Gonzales y cols. (2005) quienes mencionan un papel pronociceptivo del receptor 5-HT<sub>7</sub> a nivel de médula espinal. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Harte y cols. (2005), los investigadores administraron agonistas 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> (8-OH-DPAT) en área medial del tálamo de ratas sometidas a un dolor agudo mediante estímulo eléctrico, concluyen que la administración intratálmica de agonistas 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> tienen un efecto antinociceptivo. Sin embargo, con los hallazgos en nuestro estudio podemos concluir que el receptor implicado en la nocicepción ante un estímulo doloroso es el 5-HT<sub>1A</sub> y no el 5-HT<sub>7</sub>, esto debido a que en el estudio realizado por Harte y cols. (2005) utilizaron el mismo agonista que farmacológicamente tiene afinidad por ambos receptores. Finalmente, el efecto pronociceptivo del LEV a dosis bajas no generó cambios en la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en este estudio, este resultado nos permite decir que el efecto pronociceptivo no es modulado por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> que se encuentran en el tálamo. Podemos pensar que el efecto pronociceptivo también es modulado por receptores 5-HT, pero por otro subtipo de receptores. Por ejemplo, la 5-HT facilita los estados persistentes de tipo dolor a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, probablemente debido a un

aumento del impulso serotoninérgico descendente desde los centros superiores en el cerebro y, en particular, la médula rostral ventromedial (Asante y Dickenson, 2010). El receptor 5HT<sub>3</sub> es un canal iónico controlado por ligando que, cuando se activa, causa respuestas despolarizantes rápidas en las neuronas (Maricq y cols. 1991). La activación del receptor 5-HT<sub>3</sub> abre el canal catiónico del receptor 5-HT<sub>3</sub>, que se vuelve permeable preferentemente a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, pero también a Ca<sup>2+</sup> y otros cationes, incluido el catión orgánico guanidinio (Brüss y cols. 2000). Sagalajev y cols. (2015) sugiere que los receptores espinales 5-HT<sub>3</sub> mediaban el aumento en la hipersensibilidad neuropática.

### **10.3 Mecanismo de acción del LEV**

Las propiedades farmacocinéticas, la efectividad, la alta tolerabilidad y la baja interacción con otras drogas han generado gran interés y han abierto nuevas líneas de investigación para tratar de esclarecer el mecanismo de acción del LEV, sin embargo, estas investigaciones han sugerido diferentes mecanismos de acción. Estos estudios proporcionan evidencia de los siguientes tres objetivos moleculares principales: (I) proteína SV2A; (II) inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N, y como (III) neuromodulador de GABA, 5HT, α<sub>2</sub>-adrenérgicos y μ-opioidérgicos.

El primer mecanismo propuesto es debido a la unión de LEV a la proteína SV2A, que es una proteína de membrana integral presente en vesículas sinápticas y algunas células neuroendocrinas (Kozlowki y cols. 2015). La expresión de isoformas SV2 se ha mapeado dentro del sistema nervioso central CNS y es particularmente abundante en áreas subcorticales, como el tálamo, los ganglios basales, la corteza y



el hipocampo (Mendoza-Torreblanca y cols. 2013). El papel exacto de SV2A en el ciclo de vesículas sinápticas y la liberación de neurotransmisores sigue siendo incierto. Sin embargo, propone que SV2A podría actuar como un transportador o podría modular la exocitosis de las vesículas sinápticas que contienen el transmisor y modificar la función sináptica. En modelos animales, Kaminski y cols. (2009) concluyeron que la deficiencia de SV2A puede conducir a una mayor vulnerabilidad a los ataques y una epileptogénesis acelerada, y que la efectividad del LEV en los modelos de crisis epilépticas está mediada por SV2A. El LEV no parece afectar la fisiología normal del cerebro; por lo tanto, es posible modular la función de SV2A solo en condiciones fisiopatológicas. Sin embargo, Nowack y cols. (2011) encontraron una correlación entre el aumento de la expresión de SV2A y los cambios en el funcionamiento sináptico. Por otro lado, Lynch y cols. (2009) realizaron un estudio en pacientes con diagnóstico de epilepsia, en el que el principal objetivo fue correlacionar la variación genética en SV2A, SV2B y SV2C con la administración de LEV; los autores encontraron que no había relación entre las variaciones genéticas comunes de SV2A, SV2B o SV2C y la respuesta a LEV en la susceptibilidad a la epilepsia.

Por otra parte, el segundo mecanismo propuesto menciona que el LEV inhibe los canales de  $Ca^{2+}$  y N, revierte la inhibición de moduladores alostéricos negativos como zinc, beta-carbolinas de GABA y las corrientes de glicina, lo que ocasiona la reducción de la liberación de  $Ca^{2+}$  de las reservas intraneuronales, estos mecanismos de acción sugieren que LEV posee propiedades neuroprotectoras (Shetty, 2013). El LEV también podría estar relacionado con la capacidad de

hiperpolarizar el potencial de membrana a través de la activación de los canales de  $K^+$  y la inhibición de la entrada de  $Ca^{2+}$  (Kolosov y Goodchil, 2010). Vogl y cols. (2014) concluyeron que el LEV atenúa la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  en las neuronas del ganglio cervical superior sin ejercer efectos sobre la dependencia del voltaje de la activación e inactivación. El LEV aumenta el efecto inhibitorio presináptico de las neuronas GABAérgicas y reduce el efecto excitotóxico de las neuronas glutaminérgicas al bloquear los receptores de N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Kilicdag y cols. (2013) informaron que LEV demostró la regulación de la transmisión sináptica excitadora mediada por el receptor Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Ácido Propiónico (AMPA) en la circunvolución dentada del hipocampo actuando sobre el canal presináptico de  $Ca^{2+}$  dependiente de voltaje del tipo P / Q, que reduce la liberación de glutamato e inhibe la amplitud de la corriente postsináptica excitadora en la circunvolución dentada. El efecto antihiperalgésico del LEV y su mecanismo de acción, mediante la participación del sistema GABAérgico, Opioidérgico, Serotoninérgico y adrenérgico fue estudiado en un modelo de dolor inflamatorio por Micov y cols. (2010) Los autores informaron que LEV tiene un efecto antihiperalgésico el cual esta mediado por la activación indirecta de  $GABA_A$  central y/o periférico al aumentar la neurotransmisión GABAérgica, disminuyendo la noradrenalina a través del receptor  $\alpha_2$  adrenérgico, así mismo, la participación de varios receptores 5-HT y con una relación con receptores  $\mu$ -opioideérgicos porque estos también inhiben los canales de  $Ca^{2+}$  de tipo N de una manera dependiente del voltaje. Estos resultados sugieren que LEV posee un amplio espectro de objetivos moleculares, que responden ante diferentes estímulos, lo que hace difícil dilucidar su mecanismo de acción.

## 11. CONCLUSIONES

- 1) El Levetiracetam administrado por vía intragástrica a dosis de 300 mg/kg en ratas sometidas al modelo de dolor persistente con formalina, tiene efectos antinociceptivos.
- 2) El Levetiracetam administrado por vía intragástrica a dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg en ratas sometidas al modelo de dolor persistente con formalina, tiene efectos pronociceptivos.
- 3) El Levetiracetam presenta efectos dosis dependiente en ratas sometidas al modelo de dolor persistente con formalina.
- 4) Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> están presentes en el tálamo de rata.
- 5) Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> que se encuentran en el tálamo modula la respuesta nociceptiva.
- 6) El efecto antinociceptivo del Levetiracetam es modulado en parte por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> que se encuentran en el tálamo.
- 7) La administración de Levetiracetam no modifica la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> que se encuentran en el tálamo.

## 12. PERSPECTIVAS E IMPLICACIONES

Si bien los resultados aquí presentados postulan al LEV como fármaco con efectos antinociceptivos y pronociceptivos dependiendo de la dosis y que a su vez este efecto es modulado en parte por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub>; Creemos que el mecanismo de acción de LEV comprende una cascada de efectos en primer lugar al unirse a la proteína SV2A, modulando la excitabilidad neuronal, generando varios cambios en el SNC. Los diferentes efectos de la administración de LEV nos llevan a pensar que su farmacodinámica implica varios objetivos moleculares, pero que estos deben integrarse en un único mecanismo de acción por una sola vía. Necesitamos generar nuevas líneas de investigación con el objetivo principal de aclarar a fondo la farmacodinámica de LEV y su relación con los receptores 5-HT como moduladores a nivel talámico.

Para tal motivo, existen puntos importantes a considerar para la comprensión de cómo el dolor es modulado por los receptores serotoninérgicos en el sistema nervioso central: (i) la distribución de los diferentes receptores serotoninérgicos en la vía serotoninérgica descendente rafe-médula espinal, (ii) la dosis de agonistas o antagonistas a los receptores de 5-HT, (iii) la vía de administración de agonistas o antagonistas de los receptores de 5-HT, (iv) tipo de dolor y (v) la duración del dolor. Creemos necesario realizar nuevas líneas de investigación para aclarar la participación de los receptores 5-HT en la modulación del dolor teniendo en cuenta los puntos anteriores, el conocimiento generado con la investigación futura podría ser utilizado para la generación de nuevos medicamentos con el fin de reducir el dolor y mejorar la calidad de vida del ser humano.

### 13. REFERENCIAS

- Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, 1995;60(1):91-102.
- Abbott FV, Hong Y, Blier P. Activation of 5-HT 2A receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology*, 1996;35(1):99-110.
- Abbott FV, Melzack R, Samuel C. Morphine analgesia in the tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Experimental neurology*, 1982;75(3):644-651.
- Afifi AK, Bergman RA. Neuroanatomía funcional. Texto y atlas. México: McGraw-Hill Interamericana; 1999.
- Álaba J y Arriola E. Prevalencia de dolor en pacientes geriátricos institucionalizados. *Rev Soc Esp Dolor*. 2009;16(6):344-351.
- Ali Z, Wu G, Kozlov A, Barasi S. The actions of 5-HT 1 agonists and antagonists on nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Brain research*, 1994;661(1):83-90.
- AlmeidaTF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research* 2004;1000:40–56
- Alsaadi T, Shatzel A, Márquez A, Jorgensen J, Farías S. Clinical experience of Levetiracetam monotherapy for adults with epilepsy: 1-year follow-up study. *Seizure* 2005;14:139-42.

Asante CO, Dickenson AH. Descending serotonergic facilitation mediated by spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors engages spinal rapamycin-sensitive pathways in the rat. *Neuroscience letters*, 2010;484(2):108-112.

Bahr O, Hermisson M, Rona S, Rieger J, Nussbaum S, Kortvelyessy P, *et al.* Intravenous and oral Levetiracetam in patients with a suspected primary brain tumor and symptomatic seizures undergoing neurosurgery: the HELLO Trial. *Acta Neurochir (Wien)* 2012;154:229-35.

Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain*, 2000;86(1):11-18.

Bardin L. 2011. The complex role of serotonin receptors in chronic pain. *Behavioral Pharmacology*. 22: 390-404.

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38:1083–1152.

Baron R. Neuropathic Pain: From Mechanism to Symptoms. *The clinical Journal of Pain* 2000;16:S12-S20.

Belcher G, Ryall RW, Schaffner R. The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe stimulation on nociceptive and non-nociceptive dorsal horn interneurons in the cat, *Brain Research*, 1978;151:307-321.

Belenky MA, Pickard GE. Subcellular distribution of 5-HT<sub>1b</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 2001;432:371–388.

- Benedetti MS, Coupez R, Whomsley R, Nicolas JM, Collart P, Baltes E. Comparative pharmacokinetics and metabolism of Levetiracetam, a new anti-epileptic agent, in mouse, rat, rabbit and dog. *Xenobiotica* 2004;34:281-300.
- Ben-Menachem E, Falter U. Efficacy and Tolerability of Levetiracetam 3000 mg/d in patients with refractory partial seizures: a multicenter, double-blind, responder-selected study evaluating monotherapy. *Epilepsia* 2000;41(10):1276-83.
- Berger M., Gray J. A., Roth B. L. 2009 The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*. 60:355-366.
- Berkovic SF, Knowlton RC, Leroy RF, Schiemann J, Falter U. Placebo-controlled study of Levetiracetam in idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 2007;30(69):1751-60.
- Bickmeyer U, Heine M, Manzke T, Richter DW. Differential modulation of I<sub>h</sub> by 5-HT receptors in mouse CA1 hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 2002;16(2):209-218.
- Bonnefont J, Chapuy E, Clottes E, Alloui A, Eschalier A. Spinal 5-HT 1A receptors differentially influence nociceptive processing according to the nature of the noxious stimulus in rats: effect of WAY-100635 on the antinociceptive activities of paracetamol, venlafaxine and 5-HT. *Pain*, 2005;114(3):482-490.
- Bowker RM, Westlund KN, Sullivan MC, Coulter JD. Organization of descending serotonergic projections to the spinal cord. In H.G. Kuypers and G.E Martin

(Eds.), Descending Pathways to the Spinal Cord, Progress in Brain Research, Vol. 57, Elsevier, Amsterdam, 1982;239-265.

Brenchat A, Ejarque M, Zamanillo D, Vela, JM, Romero L. Potentiation of morphine analgesia by adjuvant activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Journal of pharmacological sciences*, 2011;116(4), 388-391.

Brenchat A, Nadal X, Romero L, Ovalle S, Muro A, Sánchez-Arroyos R, Burgueño, J. Pharmacological activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors reduces nerve injury-induced mechanical and thermal hypersensitivity. *Pain*, 2010;149(3):483-494.

Brenchat A, Romero L, García M, Pujol M, Burgueño J, Torrens A, Vela JM. 5-HT<sub>7</sub> receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *Pain*, 2009;141(3):239-247.

Brenchat A, Zamanillo D, Hamon M, Romero L, Vela JM. Role of peripheral versus spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the modulation of pain undersensitizing conditions. *European Journal of Pain*, 2012;16(1):72-81.

Brighina F, Palermo A, Aloisio A, Francolini M, Giglia G, Fierro B. Levetiracetam in the prophylaxis of migraine with aura: a 6-month open-label study. *Clin Neuropharmacol* 2006;29:338-42.

Brüss M, Barann M, Hayer-Zillgen M, Eucker T, Göthert M, Bönisch H. Modified 5-HT<sub>3A</sub> receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT<sub>3A</sub> receptor isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2000;362(4-5):392-401.



Carol MU, Allen T, Joseph S. Review of levetiracetam, with a focus on the extended release formulation, as adjuvant therapy in controlling partial-onset seizures. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2009;5:467–476.

Chudasama Y, Muir JL. Visual attention in the rat: a role for the prelimbic cortex and thalamic nuclei. *Behav Neurosci* 2001;115:417-28.

Covarrubias-Gómez A, Gutiérrez-Salmeron C, Betancourt-Sandoval J, Córdova-Domínguez JA. Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología* 2010;33:207-213.

Colpaert FC. 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: new molecular and neuroadaptive mechanisms of pain relief. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2006;7:40–47.

Coppola G, Arcieri S, D'Aniello A, Messana T, Verrotti A, Signoriello G, y cols. Levetiracetam in submaximal subcutaneous Pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Seizure* 2010;19:296-9.

Cormier J, Catherine JC. Safety and efficacy of Levetiracetam for the treatment of partial onset seizures in children from one month of age. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2013;9:295-306.

Cortes-Altamirano JL, Olmos-Hernández A, Bonilla-Jaime H, Bandala C, González-Maciél A, Alfaro-Rodríguez A. Levetiracetam as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug. *Neurology India*, 2016;64(6):1266.

Cortes-Altamirano JL, Olmos-Hernández A, Bonilla-Jaime H, Carrillo-Mora P, Bandala C, Reyes-Long S, & Alfaro-Rodríguez A. 5-Ht<sub>1</sub>, 5-Ht<sub>2</sub>, 5-Ht<sub>3</sub>, And 5-

Ht7 Receptors And Their Role In The Modulation Of Pain Response In The Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, 2018;16:210-221.

Crepeau AZ, Treiman DM. Levetiracetam: a comprehensive review. *Expert Rev Neurother* 2010;10:159-71.

Debono DJ, Hoeksema LJ, Hobbs RD. Caring for patients with chronic pain: pearls and pitfalls. *J Am Osteopath Assoc* 2013;113(8):620-7.

Dogrul A, Ossipov MH, Porreca F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain research*, 2009;1280:52-59.

Dogrul A, Seyrek M, Akgul EO, Cayci T, Kahraman S, Bolay H. Systemic paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT 7 receptors. *European journal of pharmacology*, 2012;677(1):93-101.

Dogrul A, Seyrek M. Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT7, but not 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the spinal cord. *British journal of pharmacology*, 2006;149(5):498-505.

Dubuisson D, Dennis S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1978;4:161-174.

- Eide PK, Joly NM, Hole K. The role of spinal cord 5-HT 1A and 5-HT 1B receptors in the modulation of a spinal nociceptive reflex. *Brain research*, 1990;536(1):195-200.
- El-Yassir N, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R. Heterogeneous effects of serotonin in the dorsal horn of rat: the involvement of 5-HT~ receptor subtypes, *Brain Research*, 1988;456:147-158.
- Elliot HC. *Textbook of Neuroanatomy*. Philadelphia: Lippincott; 1969.
- Esteva, E. Analgésicos: clasificación y uso. *Offarm: Farmacia y Sociedad* 2008;27(8), 68-74.
- Eya S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 2004;45:737-44.
- Falah M, Madsen C, Holbech JV, Sindrup SH. A randomized, placebo-controlled trial of Levetiracetam in central pain in multiple sclerosis. *Eur J Pain* 2012;16:860-9.
- Hunskaar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of neuroscience methods*, 1985;14(1):69-76.
- Geurts FJ, De Schutter E, Timmermans JP. Localization of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *Journal of chemical neuroanatomy*, 2002;24(1):65-74.

- Gibbs JE, Cock HR. Administration of Levetiracetam after prolonged status epilepticus does not protect from mitochondrial dysfunction in a rodent model. *Epilepsy Res* 2007;73:208-12.
- Gjerstad J, Tjølsen A, Hole K. A dual effect of 5-HT 1B receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurones in rats. *European journal of pharmacology*, 1997;335(2):127-132.
- Godínez-Chaparro B, López-Santillán FJ, Orduña P, Granados-Soto V. Secondary mechanical allodynia and hyperalgesia depend on descending facilitation mediated by spinal 5-HT 4, 5-HT 6 and 5-HT 7 receptors. *Neuroscience*, 2012;222:379-391.
- Grudt TJ, Williams JT, Travagli RA. Inhibition by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in substantia gelatinosa of guinea-pig spinal trigeminal nucleus. *J Physiol (Lond)* 1995;485:113–120.
- Gurses C, Alpay K, Ciftci FD, Bebek N, Baykan B, Gokyigit A. The efficacy and tolerability of Levetiracetam as an add-on therapy in patients with startle epilepsy. *Seizure* 2008;17:625-30.
- Hains BC, Willis WD, Hulsebosch CE. Serotonin receptors 5-HT1A and 5-HT3 reduce hyperexcitability of dorsal horn neurons after chronic spinal cord hemisection injury in rat. *Experimental brain research*, 2003;149(2):174-186.
- Hannon J., Hoyer D. 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*. 195: 198-213.

Hedlund PB, Danielson PE, Thomas EA, Slanina K, Carson MJ, Sutcliffe JG, No hypothermic response to serotonin in 5-HT7 receptor knockout mice, *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A.* 2003;100:1375–1380.

Hedlund PB, Sutcliffe JG. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT 7 receptor research. *Trends in pharmacological sciences*, 2004;25(9): 481-486.

Hensler JG, Kovachich GB, Frazer A. A quantitative autoradiographic study of serotonin1A receptor regulation. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine and antidepressant treatments. *Neuropsychopharmacology* 1991;4:131-144.

Harte SE, Kender RG, Borszcz GS. Activation of 5-HT1A and 5-HT7 receptors in the parafascicular nucleus suppresses the affective reaction of rats to noxious stimulation. *Pain*, 2005;113(3), 405-415.

Hirai T, Jones EG. A new parcellation of the human thalamus on the basis of histochemical staining. *Brain Res Rev* 1989;14:1-34.

Hori Y, Endo K, Takahashi T. Long-lasting synaptic facilitation induced by serotonin in superficial dorsal horn neurones of the rat spinal cord. *J Physiol (Lond)* 1996;492: 867–876

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PPA. VII. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 1994;46:157–203.

- Imirizaldu M, Calvo JL. Prevalencia y valoración del dolor. *Rev Rol Enf* 2009;32(6):414-20.
- Ito A, Kumamoto E, Takeda M, Shibata K, Sagai H, Yoshimura M. Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT<sub>1A</sub>-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *J Neurosci* 2000;20:6302–6308.
- Jacobs KM. Somatosensory System. In *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*, Springer International Publishing 2018 (pp. 1-7).
- Jeong CY, Choi JI, Yoon MH. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *European journal of pharmacology*, 2004;502(3):205-211.
- Jeong HJ, Mitchell VA, Vaughan CW. Role of 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes in the modulation of pain and synaptic transmission in rat spinal superficial dorsal horn. *British journal of pharmacology*, 2012;165(6):1956-1965.
- Jones KE, Puccio AM, Harshman KJ, Falcione B, Benedict N, Jankowitz BT, y cols. Levetiracetam versus Phenytoin for seizure prophylaxis in severe traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 2008;25:1-10.
- Kaminski RM, Gillard M, Leclercq K, Hanon E, Lorent G, Dassesse D, Klitgaard H. Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of levetiracetam. *Epilepsia*, 2009;50(7):1729-1740.
- Kanner R. *Secretos del Tratamiento del Dolor*. 2006; 2o Ed. México: McGrawHill.

- Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Vergé D. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors in the rat brain. *Journal of neuroscience research*, 1996;46(6):697-708.
- Kilicdag H, Daglioglu K, Erdogan S, Guzel A, Sencar L, Polat S, Zorludemir S. The effect of Levetiracetam on neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Early Hum Dev* 2013;89:355–60.
- Kim JE, Choi HC, Song HK, Jo SM, Kim DS, Choi SY, *et al.* Levetiracetam inhibits interleukin-1 beta inflammatory responses in the hippocampus and piriform cortex of epileptic rats. *Neurosci Lett* 2010;471:94-9.
- Kolosov A, Goodchild C.S. CNSB004 (Leconotide) causes antihyperalgesia without side effects when given intravenously: A comparison with ziconotide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Pain Med* 2010;11:262-73.
- Kozłowski P, Czepińska-Ćwik W, Kozłowska M, Kozłowska K. Levetiracetam—epilepsy treatment, pharmacokinetics, mechanism of action, interaction and toxicity. *J Educ Health Sport* 2015;5(4):143-50.
- Kvachnina E, Dumuis A, Włodarczyk J, Renner U, Cochet M, Richter DW, Ponimaskin E. Constitutive G<sub>s</sub>-mediated, but not G<sub>12</sub>-mediated, activity of the 5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>7</sub> (a) receptor is modulated by the palmitoylation of its C-terminal domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2009;1793(11):1646-1655.
- Lambrechts DAJE, Sadzot B, van Paesschen W, van Leusden A, Carpaye J, Bourgeois P, *et al.* Efficacy and safety of Levetiracetam in clinical practice:

results of the SKATETM trial from Belgium and The Netherlands. *Seizure* 2006;15:434-42.

Lee DS, Ryu HJ, Kim JE, Choi HC, Kim YI, Song HK, *y cols*. The effect of Levetiracetam on status epilepticus-induced neuronal death in the rat hippocampus. *Seizure* 2013;22:368-77.

Lee YJ, Kang HC, Kim HD, Lee JS. Efficacy and safety of adjunctive Levetiracetam therapy in pediatric intractable epilepsy. *Pediatr Neurol* 2010;42:86-92.

Lim DA, Chang E, Burt M, Chang S, Lamborn KR, Tarapore L, *y cols*. Safety and feasibility of switching from Phenytoin to Levetiracetam monotherapy for glioma-related seizure control following craniotomy: a randomized phase II pilot study. *J Neurooncol* 2009;93:349-54.

Liu ZY, Zhuang DB, Lunderberg T, Yu LC. Involvement of 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. *Neuroscience*, 2002;112(2):399-407.

Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 2008;137(3): 473-477.

Loscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Research* 1988;2:145–81.



- Lu Y, Perl ER. Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *J Physiol (Lond)* 2007;582:127–136.
- Lynch JM, Tate SK, Kinirons P, Weale ME, Cavalleri GL, Depondt C, Wood NW. (2009). No major role of common SV2A variation for predisposition or levetiracetam response in epilepsy. *Epilepsy research*, 2009;83(1):44-51.
- Madeja M, Margineau DG, Gorji A, Siep E, Boerrigter P, Kiligaard H, y cols. Reduction of voltage-operated potassium currents by Levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology* 2003;45:661-71.
- Margineanu DG, Matagne A, Kaminski RM, Klitgaard H. Effects of chronic treatment with Levetiracetam on hippocampal field responses after Pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Research Bulletin* 2008;77:282-5.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*, 1991;254(5030):432-437.
- Marini H, Costa C, Passaniti M, Esposito M, Campo GM, Ientile R, y cols. Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sci* 2004;74:1253-64.
- Matthys A, Haegeman G, Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P. Role of the 5-HT7 receptor in the central nervous system: from current status to future perspectives. *Molecular neurobiology*, 2011;43(3):228-253.

- Mendoza Torreblanca JG, Vanoye Carlo A, Phillips Farfán BV, Carmona Aparicio L, Gómez Lira G. Synaptic vesicle protein 2A: basic facts and role in synaptic function. *European Journal of Neuroscience*, 2013;38(11):3529-3539.
- Meuser T, Pietruck C, Gabriel A, Xie G-X, Lim K-J, Palmer PP. 5-HT7 receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. *Life Sci* 2002;71:2279–89.
- Mico JA, Berrocoso E, Ortega-Alvaro A, Gibert-Rahola J, Rojas-Corrales MO. The role of 5-HT1A receptors in research strategy for extensive pain treatment. *Curr. Top. Med. Chem.* 2006;6:1997–2003
- Micov A, Tomic M, Pecikoza U, Ugresic N, Stepanovic-Petrovic R. Levetiracetam synergises with common analgesics in producing antinociception in a mouse model of painful diabetic neuropathy. *Pharmacol Res* 2015;97:131-42.
- Micov A, Tomic M, Popovic B, Stepanovic-Petrovic R. The antihyperalgesic effect of Levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: mechanism of action. *Br J Pharmacol* 2010;161:384-92.
- Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66:355–474.
- Milligan TA, Hurwitz S, Bromfield EB. Efficacy and tolerability of Levetiracetam versus Phenytoin after supratentorial neurosurgery. *Neurology* 2008;26:71:665-9.
- Molina J, Uribe A, Figueroa J. Dolor, calidad de vida y estado anímico relacionados con la salud de pacientes ancianos hospitalizados. *Pensam Psicol* 2013; 11:43-53.

- Morel A, Magnin M, Jeanmonod D. Multiarchitectonic and stereotactic atlas of the human thalamus. *J Comp Neurol* 1997;387:588-630.
- Morrell MJ, Leppik I, French J, Ferrendelli J, Han J, Magnus L. The KEEPER trial: Levetiracetam adjunctive treatment of partial-onset seizures in an open-label community-based study. *Epilepsy Res* 2003;54:153-61.
- Muneoka KT, Takigawa M. 5-Hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor immunoreactivity-positive 'stigmoid body'-like structure in developing rat brains. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2003;21:133–143.
- Murphy RM, Zemlan FP. Selective serotonin 1A/1B agonists differentially affect spinal nociceptive reflexes. *Neuropharmacology* 1990;29:463– 468.
- Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M. (2001). Localization of 5-HT<sub>7</sub> receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *Journal of chemical neuroanatomy*, 2001;21(1):63-73.
- Noachtar S, Andermann E, Mcyvisch P, Anermann F, Gough WB, Schiemann-Delgado J. Levetiracetam for the treatment of idiopathic generalized epilepsy with myoclonic seizures. *Neurology* 2008;70:607-16.
- Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NOM-062-ZOO-1999
- Olfert E, Cross B, Mc William A. Guide for the care and use of experimental animals. *Can Counc Anim Care.* 1993;1:211.

- Oliveira AA, Almeida JP, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LM, Júnior HV, y cols. Effects of Levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after Pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol* 2007;27:395-406.
- Ozcan M, Ayar A, Canpolat S, Kutlu S. Antinociceptive efficacy of Levetiracetam in a mice model for painful diabetic neuropathy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008;52:926-30.
- Ozkale Y, Ozkale M, Saygi S, Erol I. Long-term accidental overdose of Levetiracetam in an infant. *J Child Neurol* 2014;29(7):959-61.
- Patselas PN. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clin Pharmacokinet* 2004;43:707-24.
- Pellock JM, Glauser TA, Bebin EM, Fountain NB, Ritter FJ, Coupez RM, y cols. Pharmacokinetic study of Levetiracetam in children. *Epilepsia* 2001;42(12):1574-9.
- Perena MJ, Perena MF, Rodrigo-Royo MD, Romera E. Neuroanatomía del dolor. *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2000;7:5-10,
- Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends Neurosci* 1988;11:496– 500.
- Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends in Neurosciences* 2002;25:319–25.

Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., LaMantia A. S., McNamara J., Williams S. M. 2004. Neuroscience. Sinauer Associates. 3ra Edición. EU

Radtke RA. Pharmacokinetics of levetiracetam. *Epilepsia* 2001;42:24-7.

Rocha-González HI, Meneses A, Carlton SM, Granados-Soto V. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT 7 receptors in the formalin test. *Pain*, 2005;117(1):182-192.

Rossi S, Mataluni G, Codecà C, Fiore S, Buttari F, Musella A y cols. Effects of levetiracetam on chronic pain in multiple sclerosis: results of a pilot, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Neurol* 2009;16:360–366.

Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) activating cAMP formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993;90(18):8547-8551.

Sagalajev B, Bourbia N, Beloushko E, Wei H, Pertovaara A. Bidirectional amygdaloid control of neuropathic hypersensitivity mediated by descending serotonergic pathways acting on spinal 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Behavioural brain research*, 2015;282:14-24.

Sasaki M, Ishizaki K, Obata H, Goto F. Effects of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. *European journal of pharmacology*, 2001;424(1):45-52.

Shannon H, Eberle E, Peters S. Comparison of the effects of anticonvulsant drugs with diverse mechanisms of action in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* 2005;48:1012-20.

Shetty AK. Prospects of Levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. *Front Neurol* 2013;4:1-6.

Steinbaugh LA, Lindsell CJ, Shutter LA, Szaflarski JP. Initial EEG predicts outcomes in a trial of Levetiracetam vs. Fosphenytoin for seizure prevention. *Epilepsy Behav* 2012;23:280-4.

Stepanovic-Petrovic RM, Micov A, Tomic M, Ugresic ND. The local peripheral antihyperalgesic effect of Levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth Analg* 2012;115:1457-66.

Swaroop HS, Ananya C, Nithin K, Jayashankar CA, SatishBabu HV, Srinivas BN. Levetiracetam: a review of its use in the treatment of epilepsy. *Int J Med Biomed Res* 2013;2(3):166-72.

Szaflarski JP, Sangha KS, Lindsell CJ, Shutter LA. Prospective, randomized, single-blinded comparative trial of intravenous Levetiracetam versus Phenytoin for seizure prophylaxis. *Neurocrit Care* 2010;12:165-72.

Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 1992;51(1):5-17.

- Tomic MA, Micov AM, Stepanovic-Petrovic RM. Levetiracetam interacts synergistically with nonsteroidal analgesics and caffeine to produce antihyperalgesia in rats. *J Pain* 2013;14:1371-82.
- Tomson T, Palm R, Kallen K, Ben-Menachem E, Soderfeldt B, Danielsson B, y cols. Pharmacokinetics of Levetiracetam during pregnancy, delivery, in the neonatal period, and lactation. *Epilepsia* 2007;48(6):1111-6.
- Toublanc N, Du X, Liu Y, Chen Q, Singh P, Chan R, Stockis A. Pharmacokinetics, safety and bioequivalence of levetiracetam intravenous infusion and oral tablets in healthy chinese subjects. *Clinical drug investigation*, 2015;35(8):495-503.
- Travagli RA, Williams JT. Endogenous monoamines inhibit glutamate transmission in the spinal trigeminal nucleus of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 1996;491:177–185.
- Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE. 5-HT<sub>7</sub> receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(2):70–77.
- Vogl C, Tanifuji S, Danis B, Daniels V, Foerch P, Wolff C, y cols. Synaptic vesicle glycoprotein 2A modulates vesicular release and calcium channel function at peripheral sympathetic synapses. *Eur J Neurosci* 2014;1:1-12.
- Wang H, Gao J, Lassiter TF, McDonagh DL, Sheng H, Warner DS, y cols. Levetiracetam is neuroprotective in murine models of closed head injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care* 2006;5(1):71–8.

- Wang X, Fang Y, Liang J, Yan M, Hu R, Pan X. 5-HT<sub>7</sub> receptors are involved in neurogenic dural vasodilatation in an experimental model of migraine. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2014;54(2):164-170.
- Weinstock A, Ruiz M, Gerard D, Toublanc N, Stockis A, Faroo O, y cols. Prospective open-label, single-arm, multicenter, safety, tolerability and pharmacokinetic studies of intravenous Levetiracetam in children with epilepsy. *J Child Neurol* 2013;28(11):1423-9.
- Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991;104(1):35-44.
- Yang J, Bae HB, Ki HG, Oh JM, Kim WM, Lee HG, Choi JI. Different role of spinal 5-HT (hydroxytryptamine) 7 receptors and descending serotonergic modulation in inflammatory pain induced in formalin and carrageenan rat models. *British journal of anaesthesia*, 2013;aet:336.
- Yang YC, Hu CC, Huang, CS, Chou PY. Thalamic synaptic transmission of sensory information modulate by synergistic interaction of adenosine and serotonin. *J. Neurochem.* 2014;128:852-863.
- Zachenhofer I, Donat M, Oberndorfer S, Roessler K. Perioperative Levetiracetam for prevention of seizures in supratentorial brain tumor surgery. *J Neuro Oncol* 2011;101:101-6.
- Zemlan FP, Behbehani MM, Murphy RM. Serotonin receptor subtypes and the modulation of pain transmission. *Prog Brain Res* 1988;77:349– 356.



Zemlan FP, Schwab EF. Characterization of a novel serotonin receptor subtype (5-HT<sub>1S</sub>) in rat CNS: Interaction with a GTP binding protein. *J. Neurochem.* 1991;5: 2092-2099.

Zhang YQ, Gao X, Ji GC, Wu GC. Expression of 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in rat spinal dorsal horn and some nuclei of brainstem after peripheral inflammation. *Brain research*, 2001;900(1):146-151.

Zimmermann M. "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." *Pain* 1983;16(2):109-110.

## ANEXO

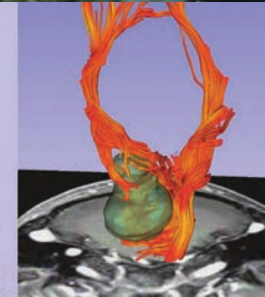
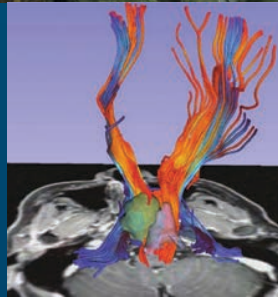
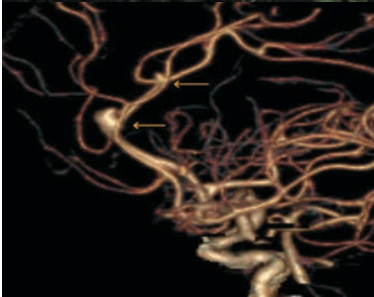
### PUBLICACIONES

- **Cortes-Altamirano, J. L.**, Olmos-Hernández, A., Bonilla-Jaime, H., Bandala, C., González-Maciel, A., & Alfaro-Rodríguez, A. Levetiracetam as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug. *Neurology India*, 2016;64(6):1266.
- **Cortes-Altamirano, J. L.**, Reyes-Long, S., Hernandez, A. O., Bonilla-Jaime, H., Mora, P. C., Bandala, C., & Alfaro-Rodríguez, A. ANTINOCICEPTIVE AND PRONOCICEPTIVE EFFECT OF LEVETIRACETAM IN TONIC PAIN MODEL. *Pharmacological Reports*, 2018;70:385-389
- **Cortes-Altamirano, J. L.**, Olmos-Hernández, A., Bonilla-Jaime, H., Carrillo-Mora, P., Bandala, C., Reyes-Long, S., & Alfaro-Rodríguez, A. 5-Ht1, 5-Ht2, 5-Ht3, And 5-Ht7 Receptors And Their Role In The Modulation Of Pain Response In The Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, 2018;16:210-221.

# Neurology India

Official Publication of the Neurological Society of India

November-December 2016 / Vol 64 / Issue 6



ISSN 0028-3886  
[www.neurologyindia.com](http://www.neurologyindia.com)

Medknow

 Wolters Kluwer

COMMENTARY

# Levetiracetam as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug

**J. L. Cortes-Altamirano, A. Olmos-Hernández<sup>1</sup>, H. Bonilla-Jaime<sup>2</sup>, C. Bandala<sup>1</sup>, A. González-Maciél<sup>3</sup>, A. Alfaro-Rodríguez<sup>1</sup>**

Department of PhD, PhD Program in Biological and Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa-Xochimilco-Cuajimalpa, México, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D.F. 04960, <sup>1</sup>Department of Neurosciences, Instituto Nacional de Rehabilitación, "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Secretaría de Salud, Col. Arenal de Guadalupe, México, D.F. 14389, <sup>2</sup>Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana Campus Iztapalapa, México, D.F. 09340, <sup>3</sup>Department of Cell and Tissue Morphology, Instituto Nacional de Pediatría, Col. Insurgentes Sur 3700-C, México, D. F. 04530, Mexico

**ABSTRACT**

The main purpose of this review was to expound upon the mechanism of action of Levetiracetam (LEV) as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug. LEV is a second-generation anti-epileptic drug (AED) that is approved for clinical use as monotherapy and may also be used for adjunctive treatment of patients with seizures. Several researchers have recommended LEV as a treatment option in different diseases causing neuronal damage, and recently, LEV has been used as an antihyperalgesic drug. LEV exhibits favorable characteristics, including a low potential for interaction, a short elimination half-life, and has neither active metabolites nor major negative effects on cognition. This has generated many new research avenues for the utilization of this drug. However, the precise mechanism of action of LEV has not been fully elucidated. In this review, a search was conducted on PubMed, ProQuest, EBSCO, and the Science Citation index for studies evaluating the effects of LEV as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug. A total of 32 studies related to the use of LEV suggested different mechanisms of action, such as binding to the synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) protein, inhibition of Ca<sup>2+</sup> N-type channels, and its presence as a neuromodulator. These studies concluded that the pharmacodynamics of LEV should be viewed as a single pathway, and should not be based on specific molecular targets that depend on the physiological or pathological conditions prevalent at that time.


**Key words:** Antiepileptic drug; epilepsy; hyperalgesic; levetiracetam; mechanism of action; neuronal damage

**Introduction**

Levetiracetam (LEV) is a second-generation anti-epileptic drug (AED) belonging to the pyrrolidone family, a class of drugs with a wide spectrum of action. LEV possesses a unique pharmacological profile compared with the traditional anticonvulsants, and it is chemically unrelated to other antiepileptic drugs.<sup>[1]</sup>

It was synthesized in the early 1980s during a chemical follow-up program aimed at identifying a second-generation

**Address for correspondence:** Dr. A. Alfaro-Rodríguez, Neurofarmacology, Department of Neurosciences, Instituto Nacional de Rehabilitación, "Luis Guillermo Ibarra Ibarra". Calzada México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, México, D.F. 14389, Mexico. E-mail: alfa1360@yahoo.com.mx

Access this article online	
Website: www.neurologyindia.com	Quick Response Code 
DOI: 10.4103/0028-3886.193801	

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

**For reprints contact:** reprints@medknow.com

**How to cite this article:** Cortes-Altamirano JL, Olmos-Hernández A, Bonilla-Jaime H, Bandala C, González-Maciél A, Alfaro-Rodríguez A. Levetiracetam as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug. *Neurol India* 2016;64:1266-75.



nootropic drug, and the initial pharmacologic studies with LEV explored its ability to facilitate cholinergic neurotransmission. LEV was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 1999, and was also approved in Europe in 2000<sup>[2]</sup> for use in adult patients with myoclonic seizures, for juvenile myoclonic epilepsy, or for primary generalized tonic-clonic seizures.<sup>[3]</sup> It was approved in India in 2005 as an adjunctive therapy in the treatment of partial-onset seizures in adults with epilepsy.<sup>[4]</sup> However, it was not until 2012 that the FDA approved LEV for use as an adjunctive therapy for partial-onset seizures in infants and children, 1 month of age and older.<sup>[5]</sup> LEV exhibits an excellent pharmacokinetic profile and has been used in a wide range of clinically complex situations.

LEV has proven to be effective in the prevention of various forms of epilepsy, has been employed as monotherapy<sup>[6-9]</sup> and adjunctive treatment<sup>[10-14]</sup> for the prevention of early post-traumatic seizures.<sup>[15-18]</sup> More recently, in neonatal seizures, the safety of LEV and its efficacy has been widely reported.<sup>[19-21]</sup> Moreover, studies have proposed that LEV possesses considerable neuroprotective properties in non-epileptic<sup>[22-24]</sup> and epileptic<sup>[25-31]</sup> disorders and even in ischemia-related epilepsy. Experimental evidence suggests that LEV provides antihyperalgesic effects in inflammatory pain,<sup>[32-34]</sup> chronic pain,<sup>[35]</sup> and neuropathic pain<sup>[36-39]</sup> models. However, the specific mechanism of action of LEV has not been fully clarified. The main purpose of this review was to summarize the current understanding of the mechanism of action of LEV as an antiepileptic, neuroprotective and hyperalgesic drug.

## I. Effect of Levetiracetam on Epilepsy Treatment

Epilepsy comprises a group of disorders characterized by two or more unprovoked seizures. Epilepsy is classified, based on the seizure source, into partial and generalized seizures.<sup>[40]</sup> LEV entails convenient twice-daily dosing, a wide margin of safety, no requirement for serum drug monitoring, and no interactions with other anticonvulsants. This advantageous pharmacological profile renders LEV an attractive first-line or adjunctive therapy for epileptic seizures [Table 1].

### Preclinical trial with LEV in epilepsy treatment

In the past, it was observed that LEV is virtually ineffective in acute-seizure animal models (i.e., maximal electroshock and pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures), which are routinely utilized to screen for potential new AEDs.<sup>[4]</sup> In contrast, recent studies have suggested that LEV provides seizure protection in various animal seizure models and

displays a favorable safety margin.<sup>[6]</sup> LEV also produces an anti-epileptogenic effect; it delays the acquisition of audiogenic kindling in Krushinsky–Molodkina rats and inhibits the development of hippocampal hyperexcitability following pilocarpine-induced status epilepticus in rats.<sup>[41]</sup> LEV has been shown to be active in animal models in terms of what are thought to represent generalized seizures. Expression of seizure activity was prevented in both audiogenic-susceptible mice and rats.<sup>[2]</sup> Furthermore, a single dose of LEV administered 30 min after the onset of behavioral status epilepticus was adequate for transiently attenuating seizure activity in animals treated with LEV at 800 mg/kg or higher.<sup>[42]</sup>

### Clinical trial with LEV in epilepsy treatment

According to Phase IV trial conducted by Lambrechts *et al.*,<sup>[10]</sup> LEV was effective and safe when added on to therapy in partial epilepsy in adults. LEV reduced seizure frequency of partial seizures (Type I) by 62.2%, of all seizure types combined (Types I + II + III) by 61.7%, and 56.6% subjects had a reduction in seizure frequency of  $\geq 50\%$ .

The efficacy and tolerability of adjunctive LEV in patients with uncontrolled generalized tonic-clonic seizures associated with idiopathic generalized epilepsies was studied by Berkovic *et al.*<sup>[11]</sup> A greater mean reduction was observed in about 56.5% subjects in the frequency of generalized tonic-clonic seizures weekly over the treatment period, when compared to the placebo treatment, where the mean reduction in seizure frequency was 28.2%. During the evaluation period, the percentage of patients free from generalized tonic-clonic seizures was 24.1% for LEV vs. 8.3% for placebo ( $P < 0.009$ ). Brodie *et al.*,<sup>[43]</sup> compared the efficacy of LEV versus carbamazepine on epilepsy. They showed that remission rates at the end of 6 months to 1 year were 80.1% with LEV and 85.4% with carbamazepine.

### Pediatric trials with LEV in epilepsy treatment

The efficacy of LEV in children with epilepsy intractable to treatment with existing antiepileptic drugs (with a mean follow-up period of 13 months and maximal follow-up period of 21 months), was studied by Lee *et al.*<sup>[19]</sup> They observed, in 48% of patients, a seizure reduction of  $\geq 50\%$ , and 22% of patients became seizure-free. Also, in reports on seizure reduction and adverse events in 130 children with intractable epilepsy treated with LEV adjunctive therapy, there was a reduction in seizures of  $\geq 50\%$  in 52% of children with partial seizures, and in 44% of children with generalized seizures. The efficacy, safety, and tolerability data in children from 1 month of age with partial-onset seizures were reviewed by Cormier *et al.*,<sup>[5]</sup> who concluded that LEV may be a safe and

effective treatment option for children and infants with partial seizures occurring due to a variety of etiologies. Moreover, the efficacy and tolerability of LEV as an add-on therapy in patients with startle epilepsy was studied by Gurses *et al.*,<sup>[13]</sup> who found that 60% of patients responded to LEV.

In an open-label study that included >300 investigators in clinical practice conducted by Morrell *et al.*,<sup>[14]</sup> the authors investigated the safety and tolerability of LEV and the medication's efficacy as an add-on therapy for partial-onset seizures. 57.9% of patients under the administration of LEV

**Table 1: The utilization of LEV for the management of epilepsy**

Author	Species	Model	Dose	Conclusion
Morrell <i>et al.</i> , 2003	Human	Phase IV, patients > 16 years old with partial-onset seizures and variety of comorbid medical conditions	LEV 500 mg bid added to their regimens, which was increased to a maximal dose of 1,500 mg bid	42.1% of patients demonstrated 100% seizure reduction during the 6 weeks of the study. The efficacy and safety of LEV was confirmed
Alsaadi <i>et al.</i> , 2003	Human	Observational study, patients with partial seizure with and without secondary generalization	Monotherapy of LEV 2,000 mg/kg and 5,000 mg/kg during the 1 year	Monotherapy of LEV can be effective and well-tolerated in adults with either new or difficult-to-control epilepsy
Lambrech <i>et al.</i> , 2006	Human	Phase IV, observational, multicenter study, patients with epilepsy > 16 years old with partial-onset seizures	LEV 1,000 mg/day, dose increased to twice weekly intervals in 1,000-mg steps, to a maximum of 3,000 mg/day, as an add-on therapy	Effective and safe as an add-on treatment for partial-onset seizures in a clinical setting
Berkovic <i>et al.</i> , 2007	Human	Randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study that enrolled adults and children with idiopathic generalized epilepsies	LEV 3,000 mg/day for adults; 60 mg/kg/day for children during 24 weeks as an add-on therapy	34.2% of patients exhibited freedom from idiopathic generalized epileptic seizures. Efficacy and tolerability were confirmed
Gurses <i>et al.</i> , 2008	Human	Adults patients with startle epilepsy	LEV 500 mg bid, escalating over 1-2 weeks to maximal doses of 3,000 mg daily, for 13-28 months	30% of patients were seizure-free, 30% had a 50-90% seizure decrease, 10% had 25-50% seizure decrease, and 30% had seizure increase
Jones <i>et al.</i> , 2008	Human	Adults patients with severe traumatic brain injury	Monotherapy of LEV 500 mg i.v. every 12 h for first 7 days after traumatic injury vs. monotherapy of phenytoin for 7 days after trauma	LEV is associated with increased seizure tendency and increased epileptiform activity on electro-encephalograms compared with phenytoin
Dudra-Jastrzebska <i>et al.</i> , 2009	Mice	Characterizes interactions between LEV and clonazepam, ethosuximide, phenobarbital, and valproate in suppressing pentylenetetrazole (PTZ)-induced clonic seizures	All drugs were administered by i.p. injection in a volume of 0.005 mL/g body weight (BW)	LEV in combination with ethosuximide, clonazepam, phenobarbital, and valproate offers potential anticonvulsant synergy in the PTZ-induced seizure model
Lim <i>et al.</i> , 2009	Human	Randomized phase II pilot study, patients with seizure history attributable to supratentorial glioma	Switching from phenytoin to LEV oral 1,000 mg twice-a-day monotherapy	LEV is effective and well-tolerated for tumor-related seizure control, especially as an add-on therapy to other AED
Coppola <i>et al.</i> , 2009	Rat	Rats with submaximal subcutaneous pentylenetetrazole-induced-seizures	Valproic acid vs. LEV, both injected i.p. in 2-3 mL/kg, 15 and 30 min prior to the induction of seizures, respectively.	LEV is efficacious against seizures triggered by subcutaneous PTZ injection given at submaximal doses in rats
Lee <i>et al.</i> , 2010	Human	Randomized phase II pilot study with pediatric patients with intractable epilepsy, aged between 10 months and 18 years	Beginning with LEV oral 10-30 mg/kg twice daily, maximal doses of 20-60 mg/kg daily as adjunctive therapy	48% of patients had seizure reduction of 50%, including 28 patients who became seizure-free, and only 7% of patients had adverse events
Szaflarski <i>et al.</i> , 2010	Human	Prospective, single-center, randomized, single-blinded study of patients with severe traumatic brain injury	LEV 3,000 mg/day vs. Phenytoin 100 mg dose, i.v. every 12 h during 7 days	There were no differences in the early seizure and short-and long-term outcomes between the phenytoin vs. LEV groups, but LEV results in fewer undesirable side effects and better long-term outcomes
Bahr <i>et al.</i> , 2012	Human	Prospective study in patients with suspected primary brain tumors and tumor-related seizures	LEV 500 mg twice daily. After 72 h, the dose was escalated to 1,000 mg twice daily, administered for 4 weeks before and until 4 weeks after a planned neurosurgical procedure	During the pre-surgical period, no seizures occurred in any of the patients, while in the postsurgical period, four patients had further seizures. Safety and tolerability of oral and i.v. LEV were excellent
Weinstock <i>et al.</i> , 2013	human	Phase 2, open-label, single-arm, multicenter study in children aged 1 month to <16 years with any type of epilepsy	LEV 14 mg/kg/day in patients aged <6 months and LEV 20 mg/kg/day in patients of 6 months of age or over to <16 years were administered in a dosage of 20 mg/kg/day, maximum 1,000 mg/day	I.v. LEV fusion in children with epilepsy is well-tolerated when administered over a period of up to 4 days. Thus, the dosage may safely be converted from oral to i.v. medication, and vice versa

experienced at least a 50% reduction in the frequency of partial-onset seizures. Also, 40.1% of patients experienced at least a 75% reduction, and 20% demonstrated a 100% seizure reduction.

#### **Monotherapy trial with LEV in epilepsy treatment**

The efficacy and tolerability of LEV administered at a dosage of 1,500 mg twice daily as monotherapy was evaluated in a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, responder-selected study conducted by Ben-Menachem *et al.*<sup>[7]</sup> These authors concluded that in the LEV monotherapy group, the median percentage of reduction in partial-seizure frequency compared with baseline was 73.8%, with a response rate of 59.2%. Conversion to LEV monotherapy (1,500 mg twice daily) is effective and well-tolerated in patients with refractory partial seizures who responded to 3,000 mg/daily LEV as an add-on therapy. In an open study by Alsaadi *et al.*,<sup>[8]</sup> two third of the patients had the same or better seizure control while one third of the non-seizure free group at 6 months of follow-up had worse seizure control at 12 months. Therefore, LEV can be an effective and well-tolerated medication in adult patients with either new or difficult-to-control epilepsy.

#### **LEV in epilepsy treatment caused by brain injuries**

Limited studies have proven the efficacy of LEV in traumatic brain injuries and in the prophylactic therapy of postoperative seizures. In a comparative study of LEV monotherapy versus phenytoin in seizure prophylaxis in severe traumatic brain injury performed Jones *et al.*,<sup>[16]</sup> the authors concluded that LEV is as effective as phenytoin in preventing early post-traumatic seizures. However, LEV monotherapy was associated with increased frequency of abnormal electroencephalographic findings.

The retrospective study investigating the efficacy and tolerability of LEV for peri-operative seizure prophylaxis in patients with supratentorial brain tumors by Zachenhofer *et al.*,<sup>[17]</sup> demonstrated the perioperative effectiveness of LEV in patients with brain tumors, leading to a lower frequency of peri-operative seizures (2.6% in the first postoperative week), accompanied by the occurrence of minor and reversible side-effects (in 6.4% of patients). Furthermore, the advantage of LEV's inability to cause cytochrome P450 enzyme induction allowed for an early initiation of an effective postoperative chemotherapy in patients with malignant glioma.

A pilot study was conducted by Lim *et al.*,<sup>[9]</sup> in which the main purpose was to assess the safety and feasibility of conversion from phenytoin to LEV monotherapy after a craniotomy for glioma resection in patients with a history of tumor-related seizures. It concluded that it is safe and feasible to

switch patients from phenytoin to LEV monotherapy after performance of a craniotomy for excision of a supratentorial glioma.

In an open-label, prospective, single-arm pilot study by Bahr *et al.*,<sup>[18]</sup> the authors assessed the efficacy and tolerability of intravenous and per oral LEV in patients with suspected primary brain tumors and tumor-related seizures. They concluded that oral and intravenous LEV was safe and effective in the perioperative treatment of tumor-related seizures. Treatment failure occurred in three patients even after dose escalation to 3,000 mg/day.

## **II. Effect of Levetiracetam as a Neuroprotective Drug**

The use of AEDs for a possible neuroprotective strategy is receiving increasing attention. Moreover, several studies have proposed that LEV possesses considerable neuroprotective properties in both epileptic and non-epileptic disorders. In this section, we evaluate the studies investigating the use of LEV in the treatment of neuronal damage [Table 2].

#### **Preclinical trial with LEV in the treatment of neuronal damage**

A preclinical study by Hanon *et al.*,<sup>[44]</sup> in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia, reported that LEV possessed neuroprotective properties as it reduced the infarct volume. LEV, therefore, induced significant neuroprotection in the rat model of focal cerebral ischemia. Furthermore, this supports the finding that the neuroprotective properties of LEV may also be relevant to its antiepileptogenic action.

Experimental observations have demonstrated that LEV protects against kainic acid-induced neurotoxicity through inhibition of the lipid peroxidation process and the inflammatory cascade in rat brain.<sup>[28]</sup> Intravenous administration of LEV in murine models that followed closed head injury and subarachnoid hemorrhage was studied by Wang *et al.*<sup>[22]</sup> The authors observed that administration of LEV (54 mg/kg) was neuroprotective against traumatic brain injury in clinically relevant animal models. Moreover, Gibbs and Cock<sup>[25]</sup> conducted a study to assess the protective effects of LEV on mitochondrial function and cellular antioxidant-reduced glutathione production, when the medication was administered after status epilepticus in rats. The final conclusion was that LEV does not possess the same protective effects on mitochondrial dysfunction and cellular antioxidant-reduced glutathione production as when administered during established status epilepticus.

The potential effect of LEV on neuronal apoptosis in neonatal rat models of hypoxic–ischemic brain injury was studied by Kilicdag *et al.*,<sup>[45]</sup> who found that LEV administration after hypoxic ischemia results in a significant decrease in the number of apoptotic cells in the hippocampus and cerebral cortex when compared with the placebo group ( $P < 0.006$ ).

In a recent study by Lee *et al.*,<sup>[19]</sup> the authors examined the efficacy of LEV as an add-on treatment with diazepam in status epilepticus-induced (SE) neuronal death. They suggested that LEV may negatively interact with diazepam and be more effective in preventing SE-induced neuronal death as a first-line drug than as a second-line therapy after benzodiazepine treatment. Furthermore, LEV alone is more efficacious for

**Table 2: The utilization of LEV for the management of neuroprotection**

Author	Species	Model	Dose	Conclusion
Marini <i>et al.</i> , 2004	Rat	Rats with brain injury induced by kainic acid (10 mg/kg)	LEV 50 mg/kg, 30 min prior to kainic acid administration. Seizure activity was rated during a 6-h period following kainic acid administration	Administration of LEV markedly blunted neuronal loss in the CA1 region in the rat hippocampus. LEV displays antioxidant and -inflammatory activities
Oliveira <i>et al.</i> , 2003	Mouse	Mice, after pilocarpine-induced seizures, were studied for their lipid peroxidation levels in the hippocampus (400 mg/kg)	LEV, 200 mg/kg, was administered i.p., and 60 min later, the mice received pilocarpine hydrochloride. The animals were killed 1 h after the injections and their brains were immediately removed	Animals that had received LEV did not have alteration in the hippocampal levels of nitrite-nitrate, had reduced catalase activity, and loss of glutathione was prevented. It was concluded that this cerebral area might contribute to the drug's ability to behave as a possible neuro-protective agent
Lee <i>et al.</i> , 2013	Rat	Rats with seizures induced by pilocarpine (30 mg/kg i.p.)	Administered 2 h after onset of status epilepticus; Diazepam (10 mg/kg i.p.), LEV (50, 100, and 150 mg/kg, i.p.), valproate (50, 100, and 150 mg/kg, i.p.), diazepam (10 mg/kg, i.p.) + LEV (50, 100, and 150 mg/kg, i.p.), diazepam (10 mg/kg, i.p.) + valproate (50, 100, and 150 mg/kg, i.p.), and diazepam (10 mg/kg, i.p.) + oxiracetam (50, 100, and 150 mg/kg, i.p.)	LEV, 50 mg/kg treatment may effectively reduce status epilepticus-induced neuronal death in CA1 pyramidal cells as compared with diazepam treatment. LEV as an add-on drug with diazepam could not alleviate status epilepticus-induced neuronal damage as compared with LEV alone
Gibbs <i>et al.</i> , 2007	Rat	Rats with an implant stimulating and recording electrode into the hippocampus were electrically stimulated 5-6 days later for 2 h to induce status epilepticus	LEV 1,000 mg/kg; 1.2 mg/mL i.p., at 12-h intervals until rats were sacrificed 44 h poststimulation	There were no significant differences in the enzymatic activities and glutathione levels between the saline-treated and the LEV-treated stimulated animals, with the protection offered when LEV was administered occurring at an earlier time-point
Wang <i>et al.</i> , 2008	Mice	Mice with closed head injury and subarachnoid hemorrhage. Head injury was induced by impact. The impactor was discharged at $6.8 \pm 0.2$ m/sec. Subarachnoid hemorrhage was induced by ligation of the external carotid artery	LEV low-dose (18 mg/kg) or high-dose (54 mg/kg) was administered i.v. after induction of closed head injury; and, after every 12 h for 3 days following subarachnoid hemorrhage	High-dose LEV was associated with significant improvement in the vestibule-motor function. LEV improves functional performance and reduces histological evidence of neuronal injury and vasospasm in mice. LEV improves functional recovery in a murine, subarachnoid-hemorrhage model
Hanon <i>et al.</i> , 2008	Rat	Rats with cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion	LEV was administered i.p., 30 min before occlusion, at doses of 5.5, 11, 22, and 44 mg/kg followed by continuous infusion (24 h) of 1.25, 2.6, 5.1, and 10.2 mg/kg per h, respectively, vs. NMDA antagonist, MK-801, i.p., 30 min before occlusion, at doses of 0.04, 0.12, or 0.40 mg/kg followed by continuous infusion (24 h) of 0.036, 0.108, or 0.360 mg/kg/per h, respectively	MK-801 can reduce the infarct size induced by middle cerebral artery occlusion in rats; however, antagonists both in patients with stroke and in those with epilepsy have revealed a high incidence of adverse effects. LEV induces significant neuro-protection in a rat model of focal cerebral ischemia without causing adverse effects
Kilicdag <i>et al.</i> , 2013	Rat	Rat pups with hypoxic ischemic brain injury induced by carotid artery ligation	LEV was administered in a dose of 80 mg/kg/day i.p. and a maintenance dose of 40 mg/kg/day after hypoxia for 7 days	Numbers of positive apoptotic cells decreased significantly in the LEV-treated group compared with the saline group ( $P=0.006$ ). The antiapoptotic properties of LEV may be related with its anti-epileptogenic action and possibly with its anti-inflammatory effect



preventing the SE-induced neurodegeneration in hippocampus than other AEDs, such as diazepam or valproate.

#### **Clinical trial with LEV in the treatment of neuronal damage**

A prospective, single-center, randomized, single-blinded comparative trial of LEV versus intravenous phenytoin in patients with severe traumatic brain injury by Szaflarski *et al.*,<sup>[26]</sup> found that LEV may be a suitable alternative to intravenous phenytoin in seizure prevention in patients with severe traumatic brain injury. LEV results in fewer undesirable side effects and better long-term effects. However, a prospective, single-blinded, comparative trial that randomized 52 patients with traumatic brain injury or subarachnoid hemorrhage to receive prophylactic LEV or fosphenytoin was conducted by Steinbaugh *et al.*<sup>[27]</sup> Its goal was to assess, utilizing the collected clinical trial data, whether or not continuous electroencephalography findings predict both short- and long-term outcomes in a well characterized patient cohort with a defined seizure prophylaxis regimen. The conclusion was that more severe slowing of the electroencephalographic activity was associated with worse outcomes, and that LEV appears to be better than fosphenytoin in controlling this phenomenon. Furthermore, Madeja *et al.*,<sup>[23]</sup> conducted a study to assess the effect of LEV on voltage-operated potassium channels and concluded that LEV exerts moderate inhibition of delayed rectifier potassium currents in the isolated hippocampal neurons, *in vitro*. Oliveira *et al.*,<sup>[30]</sup> also reported, in a study in a pilocarpine model of SE, that LEV pretreatment could counteract the oxidative stress (OS) through maintenance of lipid peroxidation, nitrite-nitrate levels, catalase activity, and glutathione at normal levels in the hippocampus. LEV displays activity against pilocarpine-induced OS in the hippocampus, which might contribute to the drug's ability to be a possible neuroprotective agent.

### **III. Effect of Levetiracetam on Hyperalgesia**

LEV is a novel anticonvulsant with proven analgesic properties. Its antinociceptive/antihyperalgesic effects have been demonstrated in animal models [Table 3].

#### **Preclinical trial with LEV in the treatment of hyperalgesia**

The effects of two-drug combinations of LEV with ibuprofen/ aspirin/paracetamol in the study of a mouse model of painful diabetic neuropathy was conducted by Micov *et al.*<sup>[46]</sup> These authors evaluated, by means of the radiant heat tail-flick test, the effect of these medications on the thermal nociceptive responses in both diabetic and non-diabetic mice. They reported a synergism between LEV and ibuprofen/ aspirin/paracetamol in this model of painful diabetic neuropathy.

Shannon *et al.*,<sup>[35]</sup> compared a broad range of clinically utilized anticonvulsant drugs in a persistent pain model with the formalin test, and reported that carbamazepine, oxcarbazepine, lamotrigine, gabapentin, and ethosuximide produced statistically significant analgesic effects in the formalin test, whereas phenytoin, topiramate, zonisamide, phenobarbital, tiagabine, valproate and LEV did not. These results suggested that the effects of these drugs may be due to different pharmacologic mechanisms.

The antinociceptive efficacy of LEV in a mice model for painful diabetic neuropathy employing the 'hot-plate test' was investigated in a study by Ozcan *et al.*<sup>[36]</sup> The results indicated that LEV induces an antihyperalgesic effect ( $P < 0.001$ ). Furthermore, the authors' results illustrate that a mouse is a good experimental model for studying the prospective agents that may be utilized for neuropathic pain.

The effect of LEV and its mechanism of action, investigated by examining the involvement of the GABAergic, opioidergic, 5-hydroxytryptaminergic (5-HTergic), and adrenergic systems in a study of inflammatory pain, was conducted by Micov *et al.*<sup>[32]</sup> They reported that LEV produced an antihyperalgesic effect that is, at least in part, mediated by GABA<sub>A</sub>, opioid, 5-HT, and  $\alpha$ 2-adrenergic receptors. Therefore, activation of the opioidergic system, in addition to that of the noradrenergic and 5-HT systems, might indicate that the analgesic effect of LEV depends on the interaction of the descending inhibitory system. Stepanovic-Petrovic *et al.*,<sup>[33]</sup> compared the antihyperalgesic and anti-edematous effects of LEV administered peripherally by local injection and the potential role of opioid, adrenergic, adenosine, 5-HT, and GABA receptors and their subtypes, in the local peripheral antihyperalgesic action of LEV. Their data suggest that LEV produces local peripheral antihyperalgesic and anti-edematous effects as well.

The effects of the two-drug combinations of LEV with non-steroidal analgesics (ibuprofen, celecoxib, and paracetamol) and caffeine on controlling hyperalgesia in localized inflammation, measured by a modified "paw-pressure" test, was a preclinical study conducted by Tomic *et al.*<sup>[34]</sup> The aim in this study was to determine the type of interaction among the components. Its data showed that the two-drug combination of LEV and nonsteroidal analgesics/caffeine could be useful in a treatment of inflammatory pain.

#### **Clinical trial with LEV in the treatment of hyperalgesia**

The effect of LEV on patients with central neuropathic pain due to multiple sclerosis was investigated in a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial by Falah *et al.*<sup>[37]</sup> Its objective was to investigate the independent effects

**Table 3: The utilization of LEV for the management of hyperalgesia**

Author	Species	Model	Dose	Conclusion
Shannon <i>et al.</i> , 2005	Rats and mice	Rats and mice with persistent pain induced by formalin (50 mL)	Morphine, carbamazepine, ethosuximide, chlor-diazepoxide, phenobarbital, phenytoin, sodium valproate, gabapentin, lamotrigine, oxcarbazepine, lev, tiagabine, topiramate, and zonisamide were administered subcutaneously (s.c.) in a 1.0- mL/kg volume in rats and of 10 mL/kg in mice	Suggests that the anticonvulsant and analgesic efficacy of these drugs may be due to different pharmacological mechanisms. Carbamazepine, oxcarbazepine, lamotrigine, gabapentin, and ethosuximide all produced statistically significant analgesic effects in the formalin test, while phenytoin, topiramate, zonisamide, phenobarbital, tiagabine, valproate and LEV did not
Brighina <i>et al.</i> , 2006	Humans	Patients in a small open-label trial affected by migraine with an aura with a high frequency of attacks	Monotherapy of LEV at a dosage of 1,000 mg/day for 6 months, starting with a dosage of 250 mg/day that was increased by 250 mg/week until reaching the final dosage of 1,000 mg/day	LEV monotherapy was generally well-tolerated and there were no serious adverse effects. LEV is effective in preventing migraine with aura attacks; these results suggest a possible role of LEV in the control of physio-pathogenetic mechanisms of migraine aura
Archer <i>et al.</i> , 2007	Rats	Rat anesthesia induced by pentobarbital (30 mg/kg), propofol (30 mg/kg), and midazolam (1.9 mg/kg)	LEV (100, 200, and 500 mg/kg). Measurements were performed 5, 15, 25, 35, 45, 55, and 65 min after injection of the anesthetic or sedative	Pretreatment with LEV can blunt the reduction of the nociceptive reflex threshold induced by small doses of anesthetics. The antihyper-algesic effect of LEV is drug-dependent
Ozcan <i>et al.</i> , 2008	Mice	Mice with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin (200 mg/kg)	A single dose of LEV i.p. 60, 300, and 900 mg/kg for untreated mice and 20, 100, and 200 mg/kg for diabetic mice	LEV (60, 300, and 900 mg/kg) did not affect nociceptive threshold values in healthy control mice; however, there were significant decreases in the pain threshold latency in diabetic mice compared with the intact group
Rossi <i>et al.</i> , 2009	Humans	Single-center, prospective, randomized, single-blind, placebo-controlled study in patients with central neuropathic pain and multiple sclerosis	LEV, 500 mg started. Treatment initiated with one tablet twice daily during week 1, gradually increasing to three tablets twice daily starting from week 4, during the 3 months	Daily doses of 2,000-3,000 LEV mg are more effective than a placebo for neuropathic pain, with pain-reduction being greater after 3 months of therapy. LEV is well-tolerated, acting beneficially against central pain, thereby improving the quality of life of patients with multiple sclerosis
Kim <i>et al.</i> , 2010	Rats	Rats with chronic epilepsy induced by pilocarpine (380 mg/kg, i.p.) at 20 min after administration of atropine methylbromide (5 mg/kg, i.p.)	LEV (30 mg/kg, i.p.) and valproic acid (VPA, 40 mg/kg, i.p.) administered daily for 1 week	LEV treatment effectively inhibited reactive gliosis; these changes were accompanied by the reduction of IL-1 and IL-1RI immunoreactivity. IL-1 plays a role in the development of neuronal cell death after traumatic, ischemic, excitotoxic, and seizure-induced brain injury
Micov <i>et al.</i> , 2010	Rats	Inflammatory pain in rats induced by carrageenan intraplantarly (at a 0.1-mL volume)	LEV (2 mL·kg <sup>-1</sup> ) per os (p.o.) body weight (BW). Bicuculline, naloxone hydrochloride, methysergide maleate, and yohimbine, all of these antagonists injected i.p. in a volume of 2 mL·kg <sup>-1</sup>	LEV (10-200 mg·kg <sup>-1</sup> ; p.o.) caused a significant dose-dependent reduction of carrageenan-induced hyperalgesia. This effect is at least partly mediated by $\alpha$ 2-adrenoceptors, GABAA, opioid, and 5-HT receptors
Stepanović-Petrovic <i>et al.</i> , 2012	Rats	Inflammatory pain in rats induced by carrageenan intraplantarly (1 mg/paw)	LEV, carrageenan, naloxone, yohimbine, bicuculline, and caffeine were dissolved or suspended in saline and injected in a final volume of 0.1 mL/paw	LEV demonstrated efficacy as a local peripheral antinociceptive drug. This effect is mediated, at least partly, through peripheral $\mu$ -opioidergic, $\alpha$ 2A, C-adrenergic, A1 adenosine, and 5-HT1B/1D receptors, but not through GABAA receptors
Falahn <i>et al.</i> , 2012	Human	Randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial in patients with central neuropathic pain due to multiple sclerosis	Slow increase of the dose of LEV over a 15-day period to 3,000 mg/day, during 6 weeks	Effect in patients with a specific type of spontaneous pain and without one type of evoked pain indicates that LEV could work by suppressing a pain generator, but that it exerts no effect in a non-selected group of patients with central neuropathic pain due to multiple sclerosis
Tomic <i>et al.</i> , 2013	Rats	Inflammatory pain in rats induced by carrageenan intraplantarly (in a 0.1-mL volume)	LEV, paracetamol, ibuprofen, and celecoxib were suspended in distilled water and administered orally (p.o.) in a volume of 2 mL/kg. Caffeine was dissolved in saline and injected (i.p.), also in a volume of 2 mL/kg BW	Two-drug combinations of LEV with nonsteroidal analgesic drugs (ibuprofen, celecoxib, and paracetamol) caused a significant and dose-dependent reduction of hyperalgesia, and LEV was as equally potent as ibuprofen, about 3 times more potent than paracetamol, and nearly 4 times less potent than celecoxib in this model. LEV possessed fewer pharmaco-kinetic interactions
Micov <i>et al.</i> , 2015	Mice	Mice with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin (150 mg/kg)	LEV, ibuprofen, aspirin, and paracetamol were suspended in distilled water and administered to mice by oral gavage (p.o.) in a volume of 10 mL/kg BW	LEV (10-100 mg/kg; p.o.), ibuprofen (2-50 mg/kg; p.o.), aspirin (5-75 mg/kg; p.o.), and paracetamol (5-100 mg/kg; p.o.) gave rise to a significant dose-dependent antinociceptive effects. Levetiracetam exerted synergistic interaction with ibuprofen/aspirin/paracetamol in a mouse model of painful diabetic neuropathy

of LEV and concomitant treatments in the management of neuropathic pain. The authors reported that the anticonvulsant LEV exerted no effect in a non-selected group of patients with central neuropathic pain due to multiple sclerosis.

Rossi *et al.*,<sup>[38]</sup> reported the effects of LEV on central neuropathic pain in multiple sclerosis subjects; they performed a single-center, prospective, randomized, single-blind, placebo-controlled study in a sample of patients who were non-responsive or intolerant to the conventional medications. Their data suggests that LEV is a well-tolerated drug, and acts beneficially against central pain, thereby improving the quality of life of patients with multiple sclerosis.

The efficacy of LEV in the prophylactic treatment for migraine was a small open-label trial conducted by Brighina *et al.*,<sup>[39]</sup> in which the patients were treated with LEV at a dosage of 1000 mg/d for 6 months. They found that LEV was generally well tolerated and was effective in the treatment of migraine.

#### Mechanisms of action

A total of 32 studies focused on studying the use of LEV as a drug for the treatment of epilepsy, neuronal damage, and hyperalgesia were included in this review. These studies suggest different mechanisms of action for LEV; however, the pharmacodynamics of this drug has not been fully elucidated. These studies provide evidence of the following three major molecular targets: SV2A protein; inhibition of Ca<sup>2+</sup> N-type channels, and the neuromodulator action on GABA, 5HT,  $\alpha$ 2-adrenergics, and  $\mu$ -opioidergic pathways. The pharmacokinetic properties, effectiveness, high tolerability, low interaction with other drugs, and various mechanisms of action proposed for LEV have generated great interest and have opened up novel avenues for clinical research.

LEV binds to a unique binding site in the brain, the protein SV2A, which is an integral membrane protein present in synaptic vesicles and some neuroendocrinal cells.<sup>[47]</sup> The expression of SV2 isoforms has been mapped at several sites within the central nervous system (CNS) and is particularly abundant in subcortical areas, such as the thalamus, basal ganglia, cortex and hippocampus.<sup>[40]</sup> The exact role of SV2A in synaptic vesicle cycling and neurotransmitter release remains uncertain. However, it is proposed that SV2A protein could act as a transporter or could modulate the exocytosis of transmitter-containing synaptic vesicles and modify synaptic function. In animal models, Kaminski *et al.*,<sup>[48]</sup> concluded that SV2A deficiency may lead to an increased seizure vulnerability and accelerated epileptogenesis, and the effectiveness of

LEV in seizure models is mediated by the SV2A protein. LEV does not appear to affect normal brain physiology; thus, it is possible to modulate SV2A function only under pathophysiological conditions. However, Nowack *et al.*,<sup>[49]</sup> found a correlation between increased SV2A expression and changes in synaptic functioning, and suggested that too much SV2 is as detrimental to neuronal function as too little of it. On the other hand, Lynch *et al.*,<sup>[50]</sup> conducted a study in patients with a confirmed diagnosis of epilepsy, where in the main purpose was to correlate the genetic variations in the SV2A, SV2B, and SV2C proteins to LEV administration; the authors found there was no relationship between the common genetic variations of SV2A, SV2B, or SV2C and the response to LEV during the assessment of susceptibility to epilepsy.

In addition, LEV inhibits Ca<sup>2+</sup> N-type channels, reverses the inhibition of negative allosteric modulators such as zinc and beta-carbolines of GABA and glycine-gated currents, and reduces calcium release from intraneuronal stores. These mechanisms of action suggest that LEV possesses neuroprotective properties.<sup>[51]</sup> LEV's action could also be related to its ability to hyperpolarize membrane potential via K<sup>+</sup> channel activation and the inhibition of Ca<sup>2+</sup> entry into the cells.<sup>[52]</sup> Vogl *et al.*,<sup>[53]</sup> concluded that the SV2A ligand, LEV, attenuates Ca<sup>2+</sup> current density in the superior cervical ganglion neurons without exerting effects on the voltage dependence of activation and inactivation. LEV increases the presynaptic inhibitory effect of GABAergic neurons and reduces the excitotoxic effect of glutaminergic neurons by blocking N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Kilicdag *et al.*,<sup>[45]</sup> reported that LEV demonstrated the regulation of amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor-mediated excitatory synaptic transmission in the dentate gyrus of the hippocampus by acting on the presynaptic P/Q-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel, thereby reducing glutamate release and inhibiting the amplitude of excitatory postsynaptic current in the dentate gyrus. Moreover, LEV possesses neuroprotective properties through its ability to upregulate the expression of glial Glutamate (Glu) transporters EAAT1/GLAST and EAAT2/GLT-1.<sup>[54]</sup>

The antihyperalgesic effect of LEV and its mechanism of action was studied by examining the involvement of GABAergic, opioidergic, 5-hydroxytryptaminergic (5-HTergic) and adrenergic systems in a rat model of inflammatory pain in a study conducted by Micov *et al.*<sup>[32]</sup> The authors reported that the effect of LEV in antihyperalgesia involves the indirect activation of central and/or peripheral GABA pathways by augmenting GABAergic

neurotransmission, decreasing noradrenaline levels via its  $\alpha_2$ -adrenergic action, as well by modulating 5-HT levels utilizing various 5-HT receptors. LEV also influenced the  $\mu$ -opioidergic receptors because these also inhibit N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in a voltage-dependent manner. These results suggest that LEV possesses a broad spectrum of molecular targets, rendering it difficult to elucidate its mechanism of action.

We think that the mechanism of action of LEV comprises a cascade of effects, that in the first instance, is exerted by binding to protein SV2A, by modulating neuronal excitability, and by generating various changes in the CNS. The different effects of the administration of LEV lead us to think that its pharmacodynamics involves various molecular targets, but that these must be integrated into a single mechanism of action by a single pathway. We need to generate new avenues of research that is conducted with the main purpose of clarifying the pharmacodynamics of LEV. This would be of immense use in supporting the administration of this antiepileptic drug as an alternative treatment to neuronal damage and hyperalgesia.

## Conclusion

LEV has been widely employed as an antiepileptic drug, and novel new research avenues have proposed the use of LEV as a neuroprotective and antihyperalgesic medication. However, till date, its mechanism of action has not been fully elucidated. This review proposes that the pharmacodynamics of LEV should be viewed as a single pathway and not as specific molecular targets that are utilized depending on the physiological or pathological conditions. We need further research to clarify the mechanism of action of LEV in order to support the utilization of this drug for various novel indications.

## Financial support and sponsorship

Nil.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## References

- Margineanu DG, Matagne A, Kaminski RM, Klitgaard H. Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Research Bulletin* 2008;77:282-5.
- Coppola G, Arcieri S, D'Aniello A, Messana T, Verrotti A, Signoriello G, *et al.* Levetiracetam in submaximal subcutaneous pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Seizure* 2010;19:296-9.
- Wang H, Gao J, Lassiter TF, McDonagh DL, Sheng H, Warner DS, *et al.* Levetiracetam is neuroprotective in murine models of closed head injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care* 2006;5:71-8.
- Loscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res* 1988;2:145-81.
- Cormier J, Catherine JC. Safety and efficacy of levetiracetam for the treatment of partial onset seizures in children from one month of age. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2013;9:295-306.
- Swaroop HS, Ananya C, Nithin K, Jayashankar CA, SatishBabu HV, Srinivas BN. Levetiracetam: A review of its use in the treatment of epilepsy. *Int J Med Biomed Res* 2013;2:166-72.
- Ben-Menachem E, Falter U. Efficacy and tolerability of levetiracetam 3000 mg/d in patients with refractory partial seizures: A multicenter, double-blind, responder-selected study evaluating monotherapy. *Epilepsia* 2000;41(10):1276-83.
- Alsaadi T, Shatzel A, Márquez A, Jorgensen J, Fariás S. Clinical experience of levetiracetam monotherapy for adults with epilepsy: 1-year follow-up study. *Seizure* 2005;14:139-42.
- Lim DA, Chang E, Burt M, Chang S, Lamborn KR, Tarapore L, *et al.* Safety and feasibility of switching from phenytoin to levetiracetam monotherapy for glioma-related seizure control following craniotomy: A randomized phase II pilot study. *J Neurooncol* 2009;93:349-54.
- Lambrechts DAJE, Sadzot B, van Paesschen W, van Leusden A, Carpaye J, Bourgeois P, *et al.* Efficacy and safety of levetiracetam in clinical practice: Results of the SKATE™ trial from Belgium and The Netherlands. *Seizure* 2006;15:434-42.
- Berkovic SF, Knowlton RC, Leroy RF, Schiemann J, Falter U. Placebo-controlled study of levetiracetam in idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 2007;30(69):1751-60.
- Noachtar S, Andermann E, Mcyvisch P, Anermann F, Gough WB, Schiemann-Delgado J. Levetiracetam for the treatment of idiopathic generalized epilepsy with myoclonic seizures. *Neurology* 2008;70:607-16.
- Gurses C, Alpay K, Ciftci FD, Bebek N, Baykan B, Gokyigit A. The efficacy and tolerability of levetiracetam as an add-on therapy in patients with startle epilepsy. *Seizure* 2008;17:625-30.
- Morrell MJ, Leppik I, French J, Ferrendelli J, Han J, Magnus L. The KEEPER trial: Levetiracetam adjunctive treatment of partial-onset seizures in an open-label community-based study. *Epilepsy Res* 2003;54:153-61.
- Milligan TA, Hurwitz S, Bromfield EB. Efficacy and tolerability of levetiracetam versus phenytoin after supratentorial neurosurgery. *Neurology* 2008;26:71:665-9.
- Jones KE, Puccio AM, Harshman KJ, Falcione B, Benedict N, Jankowitz BT, *et al.* Levetiracetam versus phenytoin for seizure prophylaxis in severe traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 2008;25:1-10.
- Zachenhofer I, Donat M, Oberndorfer S, Roessler K. Perioperative levetiracetam for prevention of seizures in supratentorial brain tumor surgery. *J Neuro Oncol* 2011;101:101-6.
- Bahr O, Hermisson M, Rona S, Rieger J, Nussbaum S, Kortvelyessy P, *et al.* Intravenous and oral levetiracetam in patients with a suspected primary brain tumor and symptomatic seizures undergoing neurosurgery: The HELLO Trial. *Acta Neurochir (Wien)* 2012;154:229-35.
- Lee YJ, Kang HC, Kim HD, Lee JS. Efficacy and safety of adjunctive levetiracetam therapy in pediatric intractable epilepsy. *Pediatr Neurol* 2010;42:86-92.
- Weinstock A, Ruiz M, Gerard D, Toublanc N, Stockis A, Faroo O, *et al.* Prospective open-label, single-arm, multicenter, safety, tolerability and pharmacokinetic studies of intravenous levetiracetam in children with epilepsy. *J Child Neurol* 2013;28:1423-9.
- Ozkale Y, Ozkale M, Saygi S, Erol I. Long-term accidental overdose of levetiracetam in an infant. *J Child Neurol* 2014;29:959-61.



22. Wang H, Gao J, Lassiter TF, McDonagh DL, Sheng H, Warner DS, et al. Levetiracetam is neuroprotective in murine models of closed head injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care* 2006;5:71-8.
23. Madeja M, Margineau DG, Gorji A, Siep E, Boerrigter P, Kilgaard H, et al. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: A novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology* 2003;45:661-71.
24. Kim JE, Choi HC, Song HK, Jo SM, Kim DS, Choi SY, et al. Levetiracetam inhibits interleukin-1 beta inflammatory responses in the hippocampus and piriform cortex of epileptic rats. *Neurosci Lett* 2010;471:94-9.
25. Gibbs JE, Cock HR. Administration of levetiracetam after prolonged status epilepticus does not protect from mitochondrial dysfunction in a rodent model. *Epilepsy Res* 2007;73:208-12.
26. Szaflarski JP, Sangha KS, Lindsell CJ, Shutter LA. Prospective, randomized, single-blinded comparative trial of intravenous levetiracetam versus phenytoin for seizure prophylaxis. *Neurocrit Care* 2010;12:165-72.
27. Steinbaugh LA, Lindsell CJ, Shutter LA, Szaflarski JP. Initial EEG predicts out-comes in a trial of levetiracetam vs. fosphenytoin for seizure prevention. *Epilepsy Behav* 2012;23:280-4.
28. Marini H, Costa C, Passaniti M, Esposito M, Campo GM, Ientile R, et al. Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sci* 2004;74:1253-64.
29. Lee DS, Ryu HJ, Kim JE, Choi HC, Kim YI, Song HK, et al. The effect of levetiracetam on status epilepticus-induced neuronal death in the rat hippocampus. *Seizure* 2013;22:368-77.
30. Oliveira AA, Almeida JP, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LM, Júnior HV, et al. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol* 2007;27:395-406.
31. Eya S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 2004;45:737-44.
32. Micov A, Tomic M, Popovic B, Stepanovic-Petrovic R. The antihyperalgesic effect of levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: Mechanism of action. *Br J Pharmacol* 2010;161:384-92.
33. Stepanovic-Petrovic RM, Micov A, Tomic M, Ugresic ND. The local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth Analg* 2012;115:1457-66.
34. Tomic MA, Micov AM, Stepanovic-Petrovic RM. Levetiracetam interacts synergistically with nonsteroidal analgesics and caffeine to produce antihyperalgesia in rats. *J Pain* 2013;14:1371-82.
35. Shannon H, Eberle E, Peters S. Comparison of the effects of anticonvulsant drugs with diverse mechanisms of action in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* 2005;48:1012-20.
36. Ozcan M, Ayar A, Canpolat S, Kutlu S. Antinociceptive efficacy of levetiracetam in a mice model for painful diabetic neuropathy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008;52:926-30.
37. Falah M, Madsen C, Holbech JV, Sindrup SH. A randomized, placebo-controlled trial of levetiracetam in central pain in multiple sclerosis. *Eur J Pain* 2012;16:860-9.
38. Rossi S, Mataluni G, Codecà C, Fiore S, Buttari F, Musella A, et al. Effects of levetiracetam on chronic pain in multiple sclerosis: Results of a pilot, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Neurol* 2009;16:360-6.
39. Brighina F, Palermo A, Aloisio A, Francolini M, Giglia G, Fierro B. Levetiracetam in the prophylaxis of migraine with aura: A 6-month open-label study. *Clin Neuropharmacol* 2006;29:338-42.
40. Mendoza-Torreblanca JG, Vanoye-Carlo A, Phillips-Farfa VB, Carmona-Aparicio L, Gómez-Lira G. Synaptic vesicle protein 2A: Basic facts and role in synaptic function. *Eur J Neurosci* 213;38:3529-39.
41. Crepeau AZ, Treiman DM. Levetiracetam: A comprehensive review. *Expert Rev Neurother* 2010;10:159-71.
42. Zheng Y, Moussally J, Cash SS, Karnam HB, Cole AJ. Intravenous levetiracetam in the rat pilocarpine-induced status epilepticus model: Behavioral, physiological and histological studies. *Neuropharmacology* 2010;58:793-8.
43. Brodie MJ, Perucca E., Ryvilin P, Ben-Menachem E, Meencke HJ. Comparison of levetiracetam and controlled release carbamazepine in newly diagnosed epilepsy. *Neurology* 2007;68:402-8.
44. Hanon E, Klitgaard H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure* 2001;10:287-93.
45. Kilicdag H, Daghoglu K, Erdogan S, Guzel A, Sencar L, Polat S, Zorludemir S. The effect of levetiracetam on neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Early Hum Dev* 2013;89:355-60.
46. Micov A, Tomic M, Pecikoza U, Ugresic N, Stepanovic-Petrovic R. Levetiracetam synergises with common analgesics in producing antinociception in a mouse model of painful diabetic neuropathy. *Pharmacol Res* 2015;97:131-42.
47. Kozłowski P, Czepińska-Ćwik W, Kozłowska M, Kozłowska K. Levetiracetam-epilepsy treatment, pharmacokinetics, mechanism of action, interaction and toxicity. *J Educ Health Sport* 2015;5:143-50.
48. Kaminski RM, Gillard M, Leclercq K, Hanon E, Lorent G, Dassel D, et al. Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of levetiracetam. *Epilepsia* 2009;50:1729-40.
49. Nowack A, Malarkey EB, Yao J, Bleckert A, Hill J, Bajjalieh SM. Levetiracetam reverses synaptic deficits produced by overexpression of SV2A. *PLOS ONE* 2011;6:e29560.
50. Lynch JM, Tate SK, Kinirons P, Weale ME, Cavalleri GL, Depondt C, et al. No major role of common SV2A variation for predisposition or levetiracetam response in epilepsy. *Epilepsy Res* 2009;83:4-51.
51. Shetty AK. Prospects of levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. *Front Neurol* 2013;4:1-6.
52. Kolosov A, Goodchild C.S. CNSB004 (Leconotide) causes antihyperalgesia without side effects when given intravenously: A comparison with ziconotide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Pain Med* 2010;11:262-73.
53. Vogl C, Tanifuji S, Danis B, Daniels V, Foerch P, Wolff C, et al. Synaptic vesicle glycoprotein 2A modulates vesicular release and calcium channel function at peripheral sympathetic synapses. *Eur J Neurosci* 2014;1:1-12.
54. Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Yokoyama H, Nakajima A, Mitsuyama Y, et al. Collapse of extracellular glutamate regulation during epileptogenesis: Down-regulation and functional failure of glutamate transporter function in rats with chronic seizures induced by kainic acid. *J Neurochem* 2001;76:892-900.

## REVIEW ARTICLE

# Review: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub> Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System

Jose Luis Cortes-Altamirano<sup>1</sup>, Adriana Olmos-Hernández<sup>2</sup>, Herlinda Bonilla Jaime<sup>3</sup>, Paul Carrillo-Mora<sup>2</sup>, Cindy Bandala<sup>2</sup>, Samuel Reyes-Long<sup>2</sup> and Alfonso Alfaro-Rodríguez<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>PhD Program in Biological and Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa-Xochimilco-Cuajimalpa, México, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D.F. 04960, Mexico; <sup>2</sup>Department of Neurosciences, Instituto Nacional de Rehabilitación, "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Secretaría de Salud, Col. Arenal de Guadalupe, México, D.F. 14389, Mexico; <sup>3</sup>Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana Campus Iztapalapa, México, D.F. 09340, Mexico; <sup>4</sup>Laboratory of Cell and Tissue Morphology, Instituto Nacional de Pediatría, Col. Insurgentes Sur 3700-C, México, D. F. 04530, Mexico

**Abstract: Background:** The aim of this review was to identify the mechanisms by which serotonin receptors involved at the central level are able to modulate the nociceptive response. Pain is a defense mechanism of the body that entails physiological, anatomical, neurochemical, and psychological changes, and is defined as an unpleasant sensory and emotional experience with potential risk of tissue damage, comprising the leading cause of appointments with Physicians worldwide. Treatment for this symptom has generated several neuropharmacological lines of research, due to the different types of pain and the various drugs employed to treat this condition. Serotonin [5-HydroxyTryptamine (5-HT)] is a neurotransmitter with seven families (5-HT<sub>1</sub>–5-HT<sub>7</sub>) and approximately 15 receptor subtypes. Serotonin modulates neuronal activity; however, this neurotransmitter is related with a number of physiological processes, such as cardiovascular function, gastric motility, renal function, *etc.* On the other hand, several researches reported that serotonin modulates nociceptive response through 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the Central Nervous System (CNS).

**Method:** In this review, a search was conducted on PubMed, ProQuest, EBSCO, and the Science Citation Index for studies evaluating the effects of 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the CNS on the modulation of different types of pain.

**Conclusion** We concluded that 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the CNS modulate the pain, but this depends on the distribution of the receptors, dose of agonists or antagonists, administration route, pain type and duration in order to inhibit, excite, or even maintain the nociceptive response.

**Keywords:** Pain, 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, central nervous system.

---

## ARTICLE HISTORY

Received: April 10, 2017  
Revised: August 24, 2017  
Accepted: September 03, 2017

DOI:  
10.2174/1570159X15666170911121027

## INTRODUCTION

Pain is a highly prevalent symptom in the majority of diseases and is the leading cause of visits to the doctor [1]. Although, at present and to the best of our knowledge, exact values are lacking, it is estimated that the prevalence of pain is 25–40% in communities, rising to 71–88% within cities. Pain, in itself, interferes with social, work, and professional activities, as well as mood and the periods of sleep and wakefulness of the patient, aspects that will definitely affect

the quality of life of the person and their environment [2]. This represents an overload, not only for the health sector due to the burden of care obligation and the consumption of direct health resources (visits to Specialists, simple x-rays, resonances, drugs, physical therapy, *etc.*), but also for the economic and social sector because of its indirect impact on the number of casualties and work disabilities. We may be able to provide a general idea of the situation on analyzing the total work produced, but only for musculoskeletal diseases (one of the most common causes of chronic pain), which represent the third most common cause of illness in Mexico according to the World Health Organization in 2015.

The increasing use of aggressive treatment schemes based on combinations of radio- and concomitant chemotherapy, altered fractionation, and dose escalation, make pain

---

\*Address correspondence to this author at the Department of Neurosciences, Instituto Nacional de Rehabilitación, "Luis Guillermo Ibarra Ibarra". Calzada México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, México, D.F. 14389, Mexico; Tel: +52(55) 59991000 ext, 19303; E-mail: [alfa1360@yahoo.com.mx](mailto:alfa1360@yahoo.com.mx)

a problem in daily clinical practice. However, it is important to note that in 40% of cases, adequate pain control is not achieved, indicating that the approach to a prevalent health problem is not much effective [1].

Many different neurotransmitter systems have been implicated in the transmission, processing, and control of pain [3]. Serotonin (5-HydroxyTryptamine, [5-HT]) is a widely distributed monoamine, in the periphery and in the Central Nervous System (CNS) and is involved in numerous physiological and behavioral disorders, such as major depression, anxiety, schizophrenia, mania, autism, obesity, pain, *etc.* 5-HT is synthesized from the amino acid L-tryptophan (from the diet) by sequential hydroxylation and decarboxylation. It is stored in presynaptic vesicles and released from nerve terminals during neuronal firing. Serotonergic neurons at the CNS level are confined to the brainstem and are located in the raphe nuclei. The neurons project to the majority of the brain, including hippocampus, midbrain, prefrontal, parietal, and occipital cortical regions, cingulate cortex, thalamus, and cerebellum, whereas, 5-HT neurons in caudal raphe nuclei project to cerebellum and spinal cord [4].

It has been established that the descending 5-HT pathways exert an inhibitory (descending inhibition) or facilitatory (descending facilitation) influence on the spinal processing of nociceptive information, depending on acute or chronic pain states and the type of receptor acted upon [5-7]. Based on pharmacological, structural, and transductional characteristics, the 5-HT receptor family is divided into seven subfamilies (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>), comprising 15 receptor subtypes, each of these corresponding to distinct genes. The involvement of the diverse receptor subtypes in pain neurotransmission remains largely unknown. Indeed, the use of relatively selective agonists and antagonists for these subtypes has led to inconsistent results due to poor selectivity of drugs and the diversity of experimental conditions [5, 8-10].

The peripheral pronociceptive role of 5-HT is well established to date; in contrast, its action at the spinal cord level and in supraspinal structures appears highly variable and remains a matter of debate [3]. The exact roles of 5-HT receptors involved in pain at the spinal cord are unelucidated. However, studies have revealed the presence of at least three families of 5-HT receptors in the spinal cord (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, and 5-HT<sub>3</sub>), with varying affinity for 5-HT, and recently the 5-HT<sub>7</sub> receptor has been postulated, which is also excitatory and which has been linked with, among other things, circadian rhythms, thermoregulation, and migraine [11].

Successful pain management therefore requires therapeutic strategies directed toward alleviating its affective attributes. The development of these strategies requires an understanding of the neurobiological mechanisms that modulate the affective dimension of pain. The main purpose of this review evaluated in detail the role of the 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors as modulators of pain response in the CNS.

## ACTIVITY OF SEROTONINERGIC RECEPTORS IN THE MODULATION OF PAIN 5-HT<sub>1</sub>

Serotonin is a neurotransmitter thought to be involved in multiple functions and that includes the modulation of the

sensory, autonomic, motor systems, arterial pressure, sexual behavior, *etc.* 5-HT modulates spinal nociceptive transmission in a complex manner: it employs the involvement of multiple 5-HT receptor subtypes and their specific localization in the CNS [12]. The 5-HT<sub>1</sub> Gi/-coupled receptor families are divided into A, B, C, D, E, and F subtypes [13-15]. 5-HT<sub>1</sub> receptors are present in the whole spinal cord and in the grey matter in all the areas examined; the major class of 5-HT receptor found in the dorsal horn is the 5-HT<sub>1</sub> family [16, 17]. Many subtypes of 5-HT<sub>1</sub> receptors potentially contributing to medullospinal pain regulation; the rostroventral medial medulla provides the major 5-HT descending pathway to the spinal superficial dorsal horn, the initial relay point for nociceptive inputs into the CNS [3]. The 5HT<sub>1A</sub> receptor has been most studied as a modulator of pain, and it appears to play a modulatory role in nociception, it has a large distribution in the CNS rendering it possible for the actions of selective agonists or antagonist for this receptor to influence various spinal and supraspinal mechanisms that modulate pain processes. 5-HT<sub>1A</sub> receptor RNA messenger (mRNA) labeling was most pronounced in the olfactory bulb, anterior hippocampal rudiment, septum, hippocampus, entorhinal cortex, interpeduncular nucleus, thalamus, and in the medullary raphe nuclei, and is widely distributed in the spinal dorsal horn [18, 19]. 5-HT<sub>1A</sub> receptor appears to be present in primary afferent nociceptive fibres, in the rostroventromedial medulla as well as in the dorsal horn of spinal cord, with 5-HT<sub>1A</sub> receptor highest density in lamina I and II. [14, 20, 21]. Administration of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in the spinal cord has produced both pro- and antiallo-dynic effects [3]. The widespread presence of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the spinal cord and in dorsal and median raphe nuclei, as well as in cortical and limbic areas, suggests a possible involvement of these receptors in emotional states, cognition, and pain modulation [22]. Studies in nonhuman primates [23] and humans indicate that many areas involved in the mediation or modulation of pain, such as the raphe nucleus, amygdala, cingulate cortex, insula, and prefrontal cortex, possess a high density of 5-HT<sub>1A</sub> receptors [24-27]. In raphe nuclei, the 5-HT<sub>1A</sub> receptors are located in serotonergic cell bodies and dendrites and function as somatodendritic autoreceptors [28]. Among the many types of serotonin receptors, the 5-HT<sub>1A</sub> receptor appears to be that which plays a significant role mediating regulatory effects of pain [29, 30]. El Yassir *et al.* [31] and Zemlan *et al.* [32] showed that both 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors were implicated in nociception at the dorsal-horn level. Indeed, 5-HT<sub>1A</sub> receptors appear to mimic the non-selective antinociceptive effects of serotonin, while 5-HT<sub>1B</sub> receptors mimic the selective effect.

Eide *et al.* [33] examined whether injection of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists in mice had the ability to alter the tail-flick reflex, and whether effects on the reflex latency involve changes in tail skin temperature. These authors found that in mouse, both 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists inhibit the nociceptive tail-flick reflex when administered into the spinal subarachnoid space, and the effect does not depend on changes in tail skin temperature. Ali *et al.* [34] adopted a single route intrathecal (i.t.), microinjection in anesthetized rats, while recordings were carried out from dorsal horn neurons on drug application in both behavioral and electrophysiological studies; the authors showed that 5-

HT increased nociceptive responses and it is suggested that this effect is associated with the activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Activity at 5-HT<sub>1B</sub> receptors has the effect of suppressing or reducing responsiveness. The increased responsiveness of dorsal-horn neurons to noxious stimulation associated with activity at 5-HT<sub>1A</sub> receptors may be associated either with increases in receptive field size, the promotion of spinal nocifensive reflexes, or facilitation of rostral transmission to specific brainstem sites. Moreover, the modulatory effects of 5-HT<sub>1B</sub> receptor activation on wide-dynamic-range neurons in the spinal cord were studied by Gjerstad *et al.*, [35]; their results demonstrated that stimulation of the 5-HT<sub>1B</sub> receptors may exert both pro- and antinociceptive effects on wide-dynamic-range neurons in the dorsal horn after repeated electrical stimulation. Likewise, Zhang *et al.* [19] reported that the excitability of dorsal-horn neurons and the sensitivity of the neurons to i.t. 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists might increase on following the inflammation model. These authors employed an intraplantar (i.p.) injection of carrageenan, which is characterized by both rapid onset and resolution of the inflammation that causes restricted distribution of hyperalgesia.

Liu *et al.* [36] conducted a study to confirm which type of 5-HT receptor was involved in the descending pathway of antinociception from the brainstem to dorsal horn of the spinal cord in rats. They reported that the 5-HT<sub>1A</sub> receptor, not the 5-HT<sub>2</sub> nor the 5-HT<sub>3</sub> receptor, plays an important role in the descending pathway of antinociception from brainstem to spinal cord in intact rats, in rats with nerve injury, and in rats with inflammation. Hains *et al.* [37] performed a study to characterize the excitability of dorsal-horn neurons to 5-HT and to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists and agonists; high densities of 5-HT<sub>3</sub> receptors are found in the substantia gelatinosa, at all levels of the spinal cord and electrophysiologic evidence demonstrates the plasticity of 5-HT systems after spinal cord injury. In addition, they indicate the importance of 5-HT modulation in the attenuation of ensuing chronic central pain.

Bonnefont *et al.* [38] made a study to investigate, according to the nature of the noxious stimulus, the manner in which the blockade of spinal 5-HT<sub>1A</sub> receptors could influence the antinociceptive actions of exogenous 5-HT, as well as of two analgesics involving endogenous 5-HT: Paracetamol and Venlafaxine. Their results showed that stimulation of the spinal 5-HT<sub>1A</sub> receptors could mediate a dual influence on the integration of nociceptive mechanisms and the stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors utilizing exogenous 5-HT or endogenous 5-HT mobilized by Paracetamol or Venlafaxine, which can elicit antinociception in the formalin test.

The role of medullary and spinal 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the endogenous regulation of neuropathic hypersensitivity was studied by Wei *et al.* [39]; they concluded that administration of a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100635, into the rostroventromedial medulla or systemically produces selective attenuation of mechanical hypersensitivity in animals with experimental neuropathy and disinhibited descending pathways, this leading to the attenuation of hypersensitivity. Jeong *et al.* [12] examined the spinal actions of a range of 5-HT<sub>1</sub> agonists, including Sumatriptan, on acute

pain, plus their effect on afferent-evoked synaptic transmission into superficial dorsal-horn neurons. These authors concluded that at the cellular level, 5-HT<sub>1A</sub>, but not 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, and 5-HT<sub>1F</sub>, receptor activation presynaptically inhibits primary afferent-evoked synaptic transmission in a subpopulation of lamina II superficial dorsal-horn neurons.

The findings displayed above raise the hypothesis that the 5-HT<sub>1A</sub> receptor inhibits the nociceptive transmission presynaptically, acting as an inhibitory autoreceptor, into the laminae I and II of the dorsal horn by an up-downregulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rostro ventromedial medulla. In contrast, 5-HT<sub>1B</sub> receptor can act as pro and nociceptive facilitator.

## 5-HT<sub>2</sub>

In rat brains, the highest levels of 5-HT<sub>2A</sub> receptors are found in the frontal cortex and other neocortical areas, claustrum, and olfactory tubercle [40] and exist in brainstem descending pain-modulation pathways, including nucleus raphe magnus, ventrolateral periaqueductal gray, and the spinal dorsal horn, reticular formation, central grey, thalamus, cerebral cortex, and limbic structures [41-42]. 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the prefrontal cortex also play an important role in cognitive functions, such as working memory, conditioned avoidance, aversive classical conditioning, and visual discrimination [43]. Contrariwise, 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA exhibits widespread distribution in the locus coeruleus, retrorubral area, substantia nigra pars compacta, ventral tegmental area, periaqueductal gray, basal nucleus, parabrachial nucleus, and laterodorsal tegmental nucleus, and the 5-HT<sub>2C</sub> receptor is involved in serotonergic control of the catecholaminergic and cholinergic areas.

Abbott *et al.* [44] conducted a study whose main purpose was to identify the receptor subtype mediating synergistic interaction between 5-HT and other inflammatory mediators; they found that 5-HT<sub>2A</sub> antagonists may be effective as peripherally acting analgesic agents and/or analgesic adjuncts. These analgesic actions would be expected to be specific to situations in which 5-HT release contributes to the generation of pain; similar results were obtained with the 5-HT<sub>3</sub> agonist. 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors have attracted interest in that they play a role in the control of mood, motor behavior, nociception, and endocrine secretion, because they are colocalized in individual neurons and, in functional models, they can modify each others' actions. To help elucidate the functional role of peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptors, Van Steenwinckel *et al.* [42] investigated their localization in lumbar dorsal root ganglia employing immunocytochemistry; these authors found that the majority of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia is localized in small- and medium-sized cell bodies, presumably nociceptive.

Millan *et al.* [45] reported that activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors enhances 5-HT<sub>1A</sub> receptor modulation in tail- flick model in rats, providing concrete support for the concept of interplay between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the expression of their functional actions. Obata *et al.* [8] examined the antiallodynic effect of i.t.-administered serotonin receptor agonists, including 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, and 5-



HT<sub>3</sub> receptor subtypes in an animal model utilizing spinal nerve ligation; they reported that administration of the 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist demonstrated dose-dependent antiallodynic actions with no associated motor weakness, this suggesting that the 5-HT<sub>2</sub> receptor plays an essential role in spinal suppression of neuropathic pain. Activation of 5-HT<sub>2</sub> receptors in dorsal horn in the spinal cord possesses antiallodynic action. The results are similar according to those of Sasaki *et al.* [9]; these authors determined the subtypes of the spinal 5-HT receptors involved in modulating nociceptive transmission in the formalin test, to better understand the pharmacological mechanisms of 5-HT-induced antinociception. Their results showed that DOI, a 5-HT<sub>2</sub>-receptor agonist (i.t.), caused a dose-dependent reduction in the number of flinches of the formalin-injected paw in both phases 1 and 2. Dorsal-horn 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors, then, inhibit nociceptive transmission in response to chemical inflammatory stimuli.

The expression of 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in the lumbar spinal dorsal horn, the nucleus of raphe magnus, ventrolateral periaqueductal gray, and the dorsal raphe nucleus following carrageenan inflammation utilizing the *in situ* hybridization technique was evaluated by Zhang *et al.* [19]; these authors reported that one hour after Carrageenan injection, the expression of 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in ipsilateral dorsal horn, bilateral nucleus of raphe magnus, ventrolateral periaqueductal gray, and dorsal raphe nucleus was significantly increased. Obata *et al.* [46] investigated the possible involvement of other associated spinal receptor systems with respect to the antiallodynic effect of a 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist; they reported that muscarinic receptors may be involved in this effect. Doly *et al.* [47] analyzed the distribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in rat spinal cord by immunocytochemistry employing an antibody directed against an N-terminal sequence of the receptor; these authors found that 5-HT<sub>2A</sub> receptors were widely distributed in the whole spinal cord, with particularly high expression in motoneuron groups, in the sympathetic preganglionic cell group, and in the dorsal horn, concluding that the 5-HT<sub>2A</sub> receptor localization is mainly postsynaptic.

Obata *et al.* [48] evaluated the antiallodynic effects of i.t. administration of 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists MK212, mCPP, and TFMPP, in a rat model of neuropathic pain induced by spinal nerve ligation; they concluded that i.t. administration of each 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist produced antiallodynic effects in a dose-dependent manner. These results suggest that stimulation of spinal 5-HT<sub>2C</sub> receptors produces antiallodynic effects *via* a different mechanism from that of 5-HT<sub>2A</sub> receptors. Nitada *et al.* [49] investigated the possible involvement of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the pathogenesis of neuropathic pain using chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats; their results indicated that the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist sarpogrelate, specifically ameliorated hyperalgesia without affecting the normal nociceptive reaction.

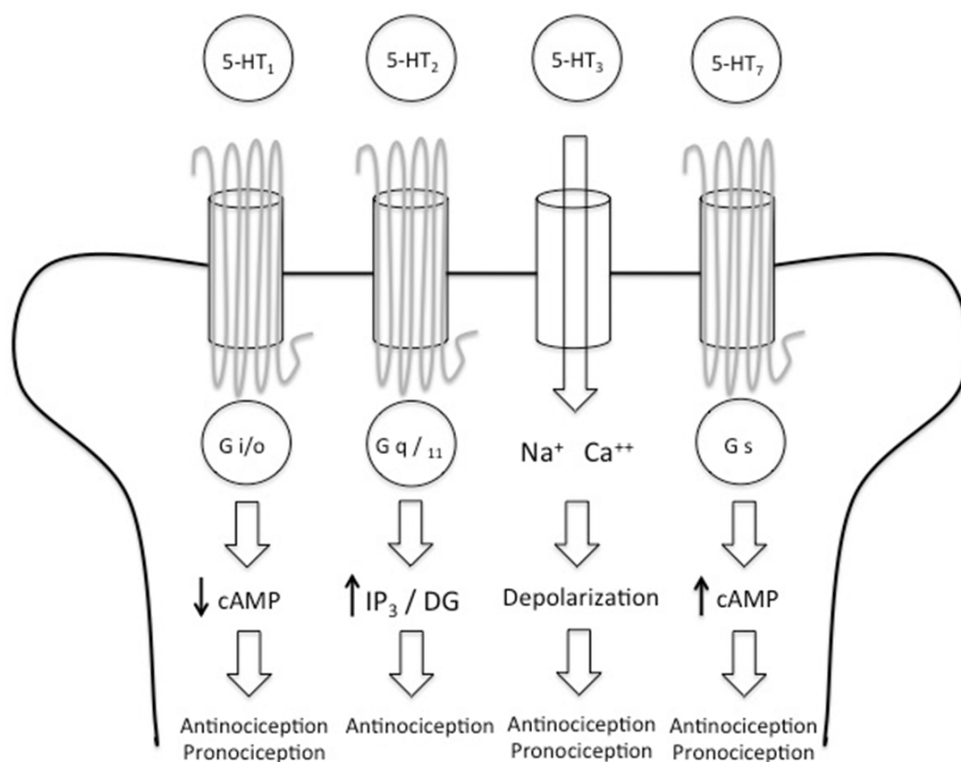
The role of peripheral serotonin 5HT<sub>2A</sub> and 5HT<sub>1A</sub> receptors on orofacial nociceptive behavioral activities evoked by the injection of formalin into the masseter muscle was evaluated in rat by Okamoto *et al.* [50]; they reported that local administration of the 5HT<sub>2A</sub> antagonist receptor, Ketanserin, but not of the 5HT<sub>1A</sub> antagonist receptor, Propranolol, into rat masseter muscle significantly reduced the orofacial no-

ciceptive behavioral activity. Wei *et al.* [51] examined the effects of intraplantar (i.p.) administration of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, Ketanserin, on hyperalgesia, inflammation, and the expression of c-fos-like immunoreactivity in spinal cord dorsal horn in the carrageenan model of inflammation; these authors showed cellular evidence indicating that peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptors are involved in nociceptive processing in the CNS and that they are responsible for the production of neuronal activity at the level of spinal cord in an inflammatory pain model. In addition, the 5-HT<sub>2A</sub> receptor and 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors are also expressed in primary afferent nociceptors. Sasaki *et al.* [10] in their study examined the effect of a selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, Sarpogrelate, on the hyperalgesia and allodynia induced by thermal injury in rats. They concluded that the antagonist blocks 5-HT<sub>2A</sub> receptors at primary afferent fiber terminals in the periphery to inhibit primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia. Dorsal root ganglion neurons expressed 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA, and stimulation of peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptors produced thermal hyperalgesia.

Kayser *et al.* [52] used mutant mice, which do not express 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, or 5-HT<sub>3A</sub> receptors, as an indirect approach to further assess the respective roles of these receptors in the physiological control of nociceptive responses in a wide range of noxious mechanical and thermal stimuli and i.p. injection of formalin. 5-HT<sub>1B</sub> and, to a lesser degree 5-HT<sub>1A</sub> receptors, mediate an endogenous inhibitory control of nociception by 5-HT, whereas 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors play a role in formalin-induced hyperalgesia in male mice and, compared with paired wild-type mice, 5-HT<sub>1A</sub> mutants exhibited increased sensitivity in the hot-plate test. Concomitant decrease of 5-HT-mediated pronociceptive influences can also be postulated as a result of 5-HT<sub>2A</sub> receptor downregulation.

5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists might aid in alleviating various kinds of neuropathic pain. Van Steenwinkel *et al.* [42] evaluated the effect of an epidural injection of MDL 11,939 (5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist) on the appearance of mechanical allodynia and hyperalgesia in model of peripheral neuropathy; they reported that there was significant upregulation of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity in the lumbar dorsal horn and peripheral nociceptive cells after peripheral neuropathy treatment. The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is involved in wide central sensitization of dorsal-horn neurons and in peripheral sensitization of nociceptive neurons. The effect of MDL 11,939 on the mechanical hypersensitivity induced by anti-neoplastic drug in rats was investigated by Thibault *et al.* [53], they reported that 5-HT<sub>2A</sub> receptors also play a pronociceptive role in the sensitization of peripheral nociceptors and in spinal nociceptive processing. Studies to clarify the mechanism of action of some drugs have been conducted. Xie *et al.* [41] reported that Tramadol treatment alters 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA expression in brainstem nuclei and the spinal dorsal horn, which may partially mediate the analgesic effect of Tramadol.

Kupers *et al.* [43] investigated the role of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor system in pain processing. They found that the 5-HT<sub>2A</sub> receptor plays a role in the processing of tonic heat pain, but not in the processing of short, phasic heat pain



**Fig. (1).** The 5-HT receptors are divided into 7 families (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub>) that comprise 15 receptor subtypes. The receptors involved in the nociceptive pathway are 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub>. 5-HT<sub>1</sub> is coupled to the G<sub>i/o</sub> protein and it reduces levels of cAMP generating anti and pronociceptive effects. 5-HT<sub>2</sub> is coupled to the G<sub>q/11</sub> protein and its activation leads to an increase of IP<sub>3</sub> and DG levels, generating an antinociceptive effect. 5-HT<sub>3</sub> is the only one that is not coupled to a G protein; instead this receptor is a ligand-gated cation channel, when activated 5-HT<sub>3</sub> depolarizes the neuronal membrane and causes antinociception but also 5-HT<sub>3</sub> can maintain the painful stimulus. 5-HT<sub>7</sub> is coupled to G<sub>s</sub> protein, its activation generates an increase in the cAMP levels causing pro and antinociceptive effects.

stimuli. 5-HT<sub>2A</sub> receptors in discrete brain areas are involved in the regulation of responses to tonic painful stimulation. The correlations observed in prefrontal and posterior cingulate cortices suggest a possible role with respect to cognitive evaluative appreciation and the emotional processing of pain (Fig. 1).

### 5-HT<sub>3</sub>

Kilpatrick *et al.* [54] found 5-HT<sub>3</sub> binding sites in the brain for the first time, and now it is known that it participates in a wide variety of functions including, notably, pain modulation. The 5-HT<sub>3</sub> receptor is a ligand-gated ion channel that, when activated, gives rise to fast, depolarizing responses in neurons [55]. Depolarization of both the fibers and the cell bodies of vagal afferents occurs in response to 5-HT<sub>3</sub> receptor activation, activating a variety of second messenger signaling systems and, through these, indirectly regulating the function of ion channels involved in local, presynaptic control of neurotransmitter release [56, 57]. 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated enhancement of 5-HT release has been reported in brain regions, for example, hippocampus, frontal cortex, hypothalamus, and raphe nucleus [58]. On the other hand, there is 5-HT<sub>3</sub> receptor expression in the medial preoptic area, dorsal tegmental nucleus, trochlear nerve nucleus, and the facial nerve nucleus. The hybridization that exists within dorsal root ganglia support a role for 5-HT<sub>3</sub> receptors

in the modulation of activity in primary sensory afferent fibers and this is consistent with the role of 5-HT<sub>3</sub> receptors in sensory processing [59]. Nayak *et al.* [60] reported that 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptors are present in isolated terminals from the corpus striatum, hippocampus, amygdala, and cerebellum of rat brain. 5-HT<sub>3</sub> receptor activation produces, among other effects, postsynaptic depolarization of neurons throughout the nuclei in the striatum and, in addition, affects both spontaneous and evoked synaptic transmission [55]. A significant proportion of 5-HT<sub>3</sub> binding sites (40%) are associated with the terminals of unmyelinated primary afferents, while others are found in intrinsic interneurons.

Comparison of the cellular population containing 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> mRNA subunits demonstrated that the population of peripheral neurons expressing the 5-HT<sub>3A</sub> subunit is larger than that expressing the 5-HT<sub>3B</sub> subunit [61]. No functional differences between the alternatively spliced 5-HT<sub>3A</sub> receptor subunits have been found to date; thus, it appears unlikely that alternative splicing of this subunit contributes to functional 5-HT<sub>3</sub> receptor heterogeneity [62]. Morales *et al.* [63] reported the distribution in rat CNS of 5-HT<sub>3</sub> receptor immunoreactivity; these authors found that it was present in the forebrain (isocortex, olfactory regions, hippocampal formation, and amygdala), brainstem (sensory and motor nuclei, and nuclei of the reticular formation), and spinal cord (dorsal and ventral horn). 5-HT<sub>3</sub> innervation of the striatum

modulates dopaminergic activity. Blandina *et al.* [64] indicated that at least part of this interaction occurs by means of the activation of a 5-HT<sub>3</sub> receptor, thus presenting, to our knowledge, the first direct evidence of a functional role of a 5-HT<sub>3</sub> receptor in brain.

Activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors produces a variety of effects, including membrane depolarization and increase in intracellular Ca<sup>2+</sup>, modulation of neurotransmitter release, excitation of central and peripheral neurons, and release of 5-HT from enterochromaffin cells of the small intestine [65]. 5-HT<sub>3</sub> receptors may increase spontaneous release by producing localized depolarization of the presynaptic terminal, leading to an increased influx of Ca<sup>2+</sup> through voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels [55]. 5-HT<sub>3</sub> receptors, in particular, are most closely related with the ACh receptor, and these receptors are present in the central and peripheral nervous systems [59]. Activation of the 5-HT<sub>3</sub> receptor opens the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor, which becomes permeable, preferentially to Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, but also to Ca<sup>2+</sup> and other cations including the organic cation guanidinium [66]. 5-HT<sub>3</sub> receptors are expressed in GABAergic interneurons; therefore, it is likely that 5-HT<sub>3</sub> receptors are localized in GABAergic nerve terminals in the basolateral amygdala, modulating synaptic GABA transmission [67]. GABA antagonists block the action of 5-HT<sub>3</sub>. Tecott *et al.* [58] have shown that the distribution of the 5-HT<sub>3A</sub> subunit closely resembles that of 5-HT<sub>3</sub>-receptor binding sites; these authors suggest that the scattered distribution of the 5-HT<sub>3</sub> receptor in forebrain may reflect expression in Gamma AminoButyric Acid (GABA)ergic interneurons. 5-HT<sub>3</sub> receptors have been suggested to be involved in dopamine release, both in the striatum and in the nucleus accumbens [68]. In the spinal cord, 5-HT<sub>3</sub> immunoreactivity was concentrated in the superficial layers of the dorsal horn in lamina I/III [69], where high densities of 5-HT<sub>3</sub>-receptor binding sites had previously been detected [56]. In addition to the postsynaptic localization of 5-HT<sub>3</sub> receptors in interneurons, 5-HT<sub>3</sub> receptors can also be found in presynaptic terminals [67].

Alhaider *et al.* [70] demonstrated that 5-HT<sub>3</sub> receptors in intrinsic spinal cord neurons inhibit nociceptive spinal transmission in both behavioral (in mouse) and electrophysiological (in rat) tests. Glaum *et al.* [55] reported that the antinociceptive effects of 5-HT in both the tail-flick and hot-plate tests were blocked following i.t. application of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ICS 205-930. 5-HT<sub>3</sub> receptors are associated with the sensory endings of primary afferents, and there is good evidence that ICS 205-930 have antinociceptive actions at this site [71]. 5-HT<sub>3</sub> receptors mediated serotonergic control of noxious transmission in the spinal cord. The responses of wide-dynamic-range (nociceptive) spinal dorsal-horn neurons to subcutaneous (s.c.) injection of formalin, and the electrically evoked responses of such neurons following intra plantar injection of carrageenan as inflammatory stimuli, was studied by Green *et al.* [72]. The authors' results revealed that, in normal animals with no inflammation, blocking the 5-HT<sub>3</sub> receptors exerted no significant effect on the electrically evoked responses of spinal dorsal-horn neurons. Moore and Weinreich [73] reported that 5-HT, a proinflammatory neurotransmitter, can activate 5-HT<sub>3</sub> receptors to depolarize vagal afferent neurons, whereas 5-HT<sub>1</sub>

and 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes bear highest affinity for the endogenous ligand and are thought to exert an overall antinociceptive action, and models of persistent pain have suggested a role for 5-HT<sub>3</sub> receptor activation in the maintenance of pain [74]. 5-HT<sub>3</sub> receptor could contribute to any central plasticity that accompanies this injury state, and the hyperalgesia and allodynia manifested after tissue injury involves different peripheral and/or central mechanisms [75].

Given that 5-HT<sub>3</sub> receptor is a ligand gated ion channel, its pharmacology has been more studied than that of the other receptors. Camilleri and Boeckxstaens [76] reviewed a variety of studies regarding the treatment of abdominal pain in the irritable bowel syndrome (IBS) including 5-HT<sub>3</sub> antagonists' alosetron and ramosetron, concluding that they were effective in treating this type of pain.

5-HT facilitates persistent pain-like states *via* the activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors, most likely due to an increased, descending serotonergic drive from higher centers in the brain and, in particular, in the rostral ventromedial medulla [68]. At the spinal cord level, blocking 5-HT<sub>3</sub> receptors reversed the increase in hypersensitivity induced by amygdaloidal administration of a low dose of glutamate. This finding suggests that spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors mediated the central nucleus of the amygdala (CEA)-induced increase of neuropathic hypersensitivity [77]. In summary, presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors increase neurotransmitter release whereas postsynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors increase activity of both projection neurons and inhibitory interneurons.

## 5-HT<sub>7</sub>

5-HT<sub>7</sub> receptors comprise the most recently described members of the serotonin receptor family. An increasing number of studies have described the distribution of 5-HT<sub>7</sub> receptor in rodents by utilizing immunohistochemical techniques [78-81]. These reports showed that the protein distribution is similar to that of the mRNA, with highest abundance in the thalamus, hypothalamus, and hippocampus [4, 82]. The 5-HT<sub>7A</sub> isoform predominates, followed by the 5-HT<sub>7B</sub> splice variant, while 5-HT<sub>7C</sub> and the 5-HT<sub>7D</sub> isoforms are least frequently expressed [83], the 5-HT<sub>7A</sub> receptor was the first splice variant cloned from human with a predicted length of 445 amino acids. In the spinal cord, 5-HT<sub>7</sub> receptors were mainly found in the superficial laminae I and II of the dorsal horn, postsynaptically in local interneurons, and presynaptically in peptidergic fibers and in astrocytes [84]. Electron microscopic examination of the dorsal horn further revealed three main localizations: postsynaptic localization in peptidergic cell bodies and in numerous dendrites; presynaptic localization in unmyelinated and thin myelinated peptidergic fibers and in astrocytes [85], the pharmacological profile of 5-HT<sub>7</sub> receptors is quite similar to that of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors subtype [86].

Five major properties appear to define the 5-HT<sub>7</sub> receptor and differentiate it from other 5-HT receptors as follows: limited sequence homology; presence and location of at least two introns; existence of an eighth hydrophobic domain; high-affinity binding of 5-HT, and positive coupling to adenylyl cyclase [87]. 5-HT<sub>7</sub> receptors stimulate cAMP formation by activating adenylyl cyclases *via* a stimulatory Gs-

protein, which also leads to Ras-dependent activation of the extracellular, signal-regulated kinases [88]. Activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors directly stimulates extracellular signal-regulated kinase in hippocampal neurons [89], an effect that can be of importance for hippocampal function and mood regulation [4]. 5-HT<sub>7</sub> receptors appear to be mainly associated with limbic brain divisions receiving serotonergic inputs (e.g., the hippocampus, amygdaloid complex, or mammillary nuclei). This suggests that 5-HT<sub>7</sub> receptors are also involved in sleep induction and hypothermia, learning, mood, and in neuroendocrine or vegetative behaviors, and such observations were confirmed in a mouse strain with a disrupted 5-HT<sub>7</sub> gene [86, 90]. Certain behavioral stimuli can trigger the electrical activity of the dorsal raphe nucleus, leading to 5-HT release and subsequent activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors in both the dorsal raphe nucleus and the medial raphe nucleus, which ultimately results in 5-HT release in the CNS [84].

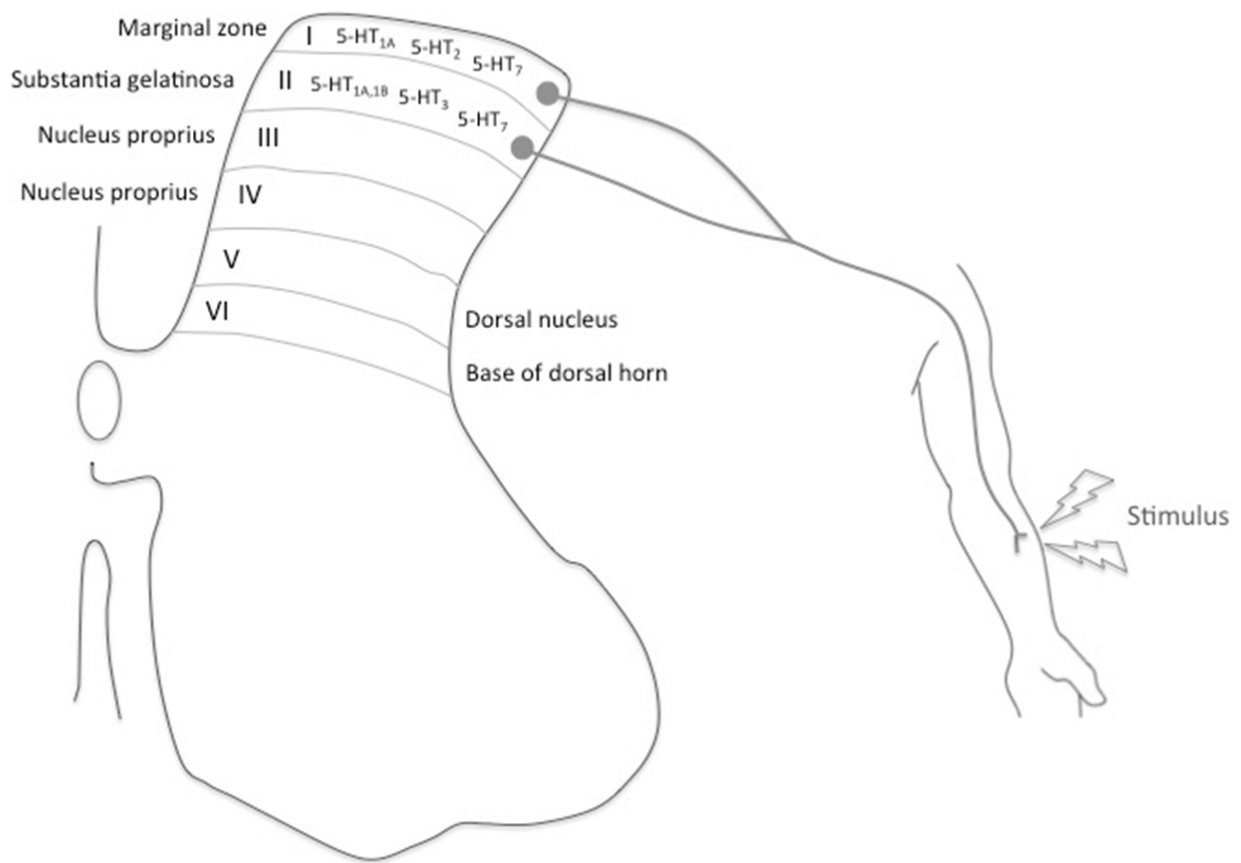
Rocha-González *et al.* [91] conducted a study in which the main purpose was to determine the possible participation of local peripheral and spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in formalin-induced nociception, employing electrophysiological, immunohistochemical, and behavioral data, the authors suggest a pronociceptive role for the 5-HT<sub>7</sub> receptor in the dorsal horn of the spinal cord. Microinjection of formalin was preceded by either local or spinal administration of SB-269970 and/or 5-HT, both known for their antinociceptive activity, which significantly reduced formalin-induced flinching, while local 5-HT or 5-CT dose-dependently augmented the formalin-induced nociceptive behavior. On the other hand, the role of spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the antinociceptive effects of systemic morphine was elucidated in a study conducted by Drogul and Seyrek [92], these authors reported that systemically administered morphine activates the descending serotonergic pathways and that 5-HT<sub>7</sub> receptors in the spinal cord play an important role in systemic morphine antinociception. Brenchat *et al.* [93] evaluated the potential role of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in nociception associated with a sensitizing stimulus in mice; intrinsic efficacy as an activator of human 5-HT<sub>7</sub> receptors and the selectivity of 5-HT<sub>7</sub> receptor agonists used were also investigated. Their results showed that 5-HT<sub>7</sub> receptors participate in antinociceptive mechanisms and 5-HT<sub>7</sub> receptor blockade by i.t. administration of SB-269970, inhibiting the antinociceptive effect of systemic morphine in the tail-flick test. The following year, Brenchat *et al.* [94] examined whether 5-HT<sub>7</sub> receptors participates in some modulatory control of nerve injury-evoked mechanical hypersensitivity and thermal hyperalgesia in mice. These authors found a significant increase of 5-HT<sub>7</sub> immunoreactivity in laminae I–II and III–V of the dorsal horn on the ipsilateral side of the spinal cord 11 days after nerve injury. In the case of 5-HT<sub>7</sub> receptors, a recent study found that systemic administration of 5-HT<sub>7</sub> receptor agonists reduced mechanical hypersensitivity in nerve-injured mice, suggesting that 5-HT<sub>7</sub> receptors play an antinociceptive role. Studies suggest that spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors may play a pronociceptive, rather than an antinociceptive, role [82]. Likewise, systemic and spinal administration of the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist SB-269970 reduces the tactile allodynia induced by L5/L6 spinal nerve ligation, and 5-HT<sub>7</sub> receptors possess a pronociceptive

role in this type of pain spinal nerve ligation, which leads to a reduction in the level of 5-HT<sub>7</sub> receptors [95].

The analgesic effect of morphine co-administered with the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor agonist E-55888, the antagonist SB-258719, or both, was evaluated by Brenchat *et al.* [96]. They reported on 5-HT<sub>7</sub> receptors in opioid analgesia and pointed out a potential use of 5-HT<sub>7</sub> receptor agonists as adjuvants of opioid analgesia; systemic administration of a selective 5-HT<sub>7</sub> receptor agonist per se is not sufficient to reproduce the antinociception exerted by opioids in acute thermal nociceptive models. The respective roles of peripheral and spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the modulation of mechanical hypersensitivity were investigated under two different experimental pain conditions by Brenchat *et al.* [97]; they demonstrated that activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors exerts antinociceptive effects at the spinal cord level and pronociceptive effects at the periphery. A previous study at the light microscope level revealed that 5-HT<sub>7</sub> receptors co-localize with GABA in neurons of the spinal-cord dorsal horn [93], and it has been reported that spinal GABAergic interneurons are involved in 5-HT<sub>7</sub> receptor-mediated antinociception. Dogrul *et al.* [98] investigated the role of descending serotonergic pathways and spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors compared with 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in terms of the antinociceptive and antihyperalgesic effects of Paracetamol; they reported that activation of descending serotonergic pathways and spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors following systemic administration of Paracetamol produces antinociceptive and antihyperalgesic effects, and that the 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist blocks the antinociceptive and antihyperalgesic effects of systemic Paracetamol, indicating a novel role of spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the mechanism of action of Paracetamol. The role of spinal 5-HT and 5-HT<sub>4/6/7</sub> receptors in the long-term secondary mechanical allodynia and hyperalgesia induced by formalin in rat comprised a study conducted by Godínez-Chaparro *et al.* [99]; these authors showed that formalin activates a descending serotonergic system, which releases 5-HT at the spinal cord and contributes to the development and maintenance of secondary allodynia and hyperalgesia. Viguier *et al.* [100] investigated how 5-HT<sub>7</sub> receptors contribute to neuropathic pain modulation by using potent 5-HT<sub>7</sub> receptors antagonist (SB-269970) and/or agonists (MSD-5a, AS-19, E-55888) in rats with unilateral ligations of the sciatic nerve or the infraorbital nerve, reporting that 5-HT<sub>7</sub> receptors mediated inhibitory control of the neuropathic pain underlying the excitation of GABAergic interneurons within the dorsal horn. Yang *et al.* [101] compared the role of 5-HT<sub>7</sub> receptors and the influence of descending serotonergic modulation between formalin- and carrageenan-induced inflammatory pain; they concluded that activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors exerted a significant antinociceptive effect on formalin-induced pain, but no effect on carrageenan-induced pain, indicating differences in the involvement of 5-HT<sub>7</sub> receptors according to the pain modality, (Fig. 2).

## DISCUSSION

Multiple 5-HT receptors exist in the central nervous system, and the serotonin in the raphe-spinal pathway has been implicated in playing an important role in analgesia. The main purpose of this review was to analyze the modulation



**Fig. (2).** The dorsal horn is the area that receives the painful stimuli; it is divided into five Rexed laminae. The 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors are mainly located in the lamina I and II. The receptor involved in antinociception (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>7</sub>) receptors are mainly expressed in the lamina I, also known as marginal zone. This lamina is mostly innervated by A- $\delta$  fibers. In the lamina II, substantia gelatinosa, the receptors involved in pronociception (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub>) are expressed. This lamina is innervated by C fibers.

of pain by 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors at the central level. A total of 70 studies from different authors were evaluated, and we found certain differences and commonalities among these studies.

Several lines of evidence have implicated a role for the serotonin-containing component of the raphe-spinal system in modulating nociception. Medullary nucleus raphe magnus is thought to be a major source of the descending serotonin that contains fibers terminating in the spinal cord [102]. The physiological functions of the spinal cord and the impact of 5-HT on these are distributed in the following four areas: the first is the dorsal horn, which corresponds to primary relay of nociceptive inputs; the intermediolateral cell column from which originate the sympathetic preganglionic neurons is the second area, the third area is the central canal that might be involved in exchanges with the cerebrospinal fluid, and the last area is the ventral horn, which is implicated in motor functions [37]. Serotonin-containing axons descending from the brainstem are known to terminate in the ventral horn and in the intermediolateral column, as well as in the dorsal horn [103]. At the cellular level, 5-HT produces both pre- and postsynaptic inhibition and excitation within the spinal and trigeminal superficial dorsal horn [12, 104-108].

Different techniques, drugs, and pain models have been employed to determine the distribution of the different sero-

tonergic receptors that are able to modulate the nociceptive response mediated by the descending system at the spinal cord and the presence of 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in different amounts and at different levels was reported with the majority of these studies implicating these receptors in pain inhibition. However, these studies mention the involvement of these receptors in hyperalgesia, or even in maintaining the painful stimulus. Furthermore, there have been different pain models that have attempted to explain the involvement of serotonergic receptors in the nociceptive response (the tail-flick test, the hot-plate test, the formalin test, the carrageenan test, *etc.*); these studies reported that the type of pain (acute pain, inflammatory pain, neuropathic pain, tonic pain, or chronic pain) determine which and how the serotonergic receptors participate. Investigation with administration agonists or antagonists regarding 5-HT receptors showed that the anti- or hyperalgesic effect depends on the drug dose in all of the receptors. Finally, several authors have reported that the participation of serotonergic receptors depends on pain duration, and different serotonergic receptors may even participate in conjunction to inhibit, excite, or maintain the painful stimulus. In summary, there are important points to consider in order to understand how pain is modulated by serotonergic receptors in the central nervous system as follows: (i) the distribution of the different serotonergic receptors in the raphe-spinal pathway; (ii) the dose

of agonists or antagonists on terms of the 5-HT receptors; (iii) the route of administration of agonists or antagonists with respect to the 5-HT receptors; (iv) the type of pain, and (v) pain duration. We think it necessary to engage in novel lines of investigation to clarify the involvement of 5-HT receptors in the modulation of pain considering the abovementioned points. The knowledge generated with future research could be used for generating new drugs and therapies to reduce pain and to improve the quality of life of patients.

## CONCLUSION

We concluded that 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the CNS intervene in the modulation of pain, but this modulation depends on the distribution of the receptors, the dose of agonists or antagonists, the route of administration, and the type and duration of pain required to inhibit, excite, or even maintain the nociceptive response.

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

## REFERENCES

- Imirizaldu, M.; Calvo, J.L. Prevalencia y valoración del dolor. *Revista ROL de Enfermería*, **2009**, 32(6), 414-420.
- Molina, J.; Uribe, A.; Figueroa, J. Dolor, calidad de vida y estado anímico relacionados con la salud de pacientes ancianos hospitalizados. *Pensamientos en Psicología*, **2013**, 11, 43-53.
- Millan, M.J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, **2002**, 66, 355-474.
- Hedlund, P.B.; Sutcliffe, J.G. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT<sub>7</sub> receptor research. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2004**, 25(9), 481-486.
- Bardin, L.; Lavarenne, J.; Eschalier, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain*, **2000**, 86(1), 11-18.
- Jeong, C.Y.; Choi, J.I.; Yoon, M.H. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *European Journal of Pharmacology*, **2004**, 502(3), 205-211.
- Dogrul, A.; Ossipov, M.H.; Porreca, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Research*, **2009**, 1280, 52-59.
- Obata, H.; Saito, S.; Sasaki, M.; Ishizaki, K.; Goto, F. Antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT<sub>2</sub> agonists in rats with nerve ligation. *Pain*, **2001**, 90(1), 173-179.
- Sasaki, M.; Ishizaki, K.; Obata, H.; Goto, F. Effects of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. *European Journal of Pharmacology*, **2001**, 424(1), 45-52.
- Sasaki, M.; Obata, H.; Kawahara, K.; Saito, S.; Goto, F. Peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *Pain*, **2006**, 122(1), 130-136.
- Leopoldo, M.; Lacivita, E.; Berardi, F.; Perrone, R.; Hedlund, P.B. Serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor agents: structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, **2011**, 129(2), 120-148.
- Jeong, H.J.; Mitchell, V.A.; Vaughan, C.W. Role of 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes in the modulation of pain and synaptic transmission in rat spinal superficial dorsal horn. *British Journal of Pharmacology*, **2012**, 165(6), 1956-1965.
- Peroutka, S.J. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends in Neurosciences*, **1988**, 11, 496-500.
- Zemlan, F.P.; Behbehani, M.M.; Murphy, R.M. Serotonin receptor subtypes and the modulation of pain transmission. *Progress in Brain Research*, **1988**, 77, 349-356.
- Barnes, N.M.; Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, **1999**, 38, 1083-1152.
- Zemlan, F.P.; Schwab, E.F. Characterization of a novel serotonin receptor subtype (5-HT<sub>1S</sub>) in rat CNS: Interaction with a GTP binding protein. *Journal of Neurochemistry*, **1991**, 5, 2092-2099.
- Murphy, R.M.; Zemlan, F.P. Selective serotonin 1A/1B agonists differentially affect spinal nociceptive reflexes. *Neuropharmacology*, **1990**, 29, 463-468.
- Wright, D.E.; Seroogy, K.B.; Lundgren, K.H.; Davis, B.M.; Jennes, L. Comparative localization of serotonin<sub>1A</sub>, <sub>1C</sub>, and <sub>2</sub> receptor subtype mRNAs in rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, **1995**, 351(3), 357-373.
- Zhang, Y.Q.; Gao, X.; Ji, G.C.; Wu, G.C. Expression of 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in rat spinal dorsal horn and some nuclei of brainstem after peripheral inflammation. *Brain Research*, **2001**, 900(1), 146-151.
- Marlier, L.; Teilhac, J.R.; Cerruti, C.; Privat, A. Autoradiographic mapping of 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat spinal cord. *Brain Research*, **1991**, 550(1), 15-23.
- Laporte, A.M.; Fattaccini, C.M.; Lombard, M.C.; Chauveau, J.; Hamon, M. Effects of dorsal rhizotomy and selective lesion of serotonergic and noradrenergic systems on 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat spinal cord. *Journal of Neural Transmission*, **1995**, 100, 207-223.
- Hensler, J.G.; Kovachich, G.B.; Frazer, A. A quantitative autoradiographic study of serotonin<sub>1A</sub> receptor regulation. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine and antidepressant treatments. *Neuropsychopharmacology*, **1991**, 4, 131-144.
- Azmitia, E.C.; Gannon, P.J.; Kheck, N.M.; Whitaker-Azmitia, P.M. Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology*, **1996**, 14, 35-46.
- Parsey, R.V.; Slifstein, M.; Hwang, D.R.; Abi-Dargham, A.; Simpson, N.; Mawlawi, O.; Guo, N.N.; Van Heertum, R.; Mann, J.J.; Laruelle, M. Validation and reproducibility of measurement of 5-HT<sub>1A</sub> receptor parameters with [<sup>11</sup>C]WAY-100635 in humans: comparison of arterial and reference tissue input functions. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **2000**, 20, 1111-1133.
- Rabiner, E.A.; Messa, C.; Sargent, P.A.; Husted-Kjaer, K.; Montgomery, A.; Lawrence, A.D.; Bench, C.J.; Gunn, R.N.; Cowen, P.; Grasby, P.M. A database of [<sup>11</sup>C]WAY-100635 binding to 5-HT<sub>1A</sub> receptors in normal male volunteers: normative data and relationship to methodological, demographic, physiological, and behavioral variables. *NeuroImage*, **2002**, 15, 620-632.
- Hirvonen, J.; Kajander, J.; Allonen, T.; Oikonen, V.; Nägren, K.; Hietala, J. Measurement of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding using positron emission tomography and [<sup>11</sup>C]WAY-100635—considerations on the validity of cerebellum as a reference region. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **2007**, 27:185-195.
- Martikainen, I.K.; Hirvonen, J.; Kajander, J.; Hagelberg, N.; Mansikka, H.; Nägren, K.; Pertovaara, A. Correlation of human cold pressor pain responses with 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in the brain. *Brain Research*, **2007**, 1172, 21-31.
- Riad, M.; Garcia, S.; Watkins, K.C.; Jodoin, N.; Doucet, E.; Langlois, X.; el Mestikawy, S.; Hamon, M.; Descarries, L. Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, **2000** 417, 181-194.

- [29] Colpaert, F.C. 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: new molecular and neuroadaptive mechanisms of pain relief. *Current Opinion on Investigative Drugs*, **2006**, 7, 40-47.
- [30] Mico, J.A.; Berrocoso, E.; Ortega-Álvarez, A.; Gibert-Rahola, J.; Rojas-Corrales, M.O. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in research strategy for extensive pain treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2006**, 6, 1997-2003.
- [31] El-Yassir, N.; Fleetwood-Walkerm, S.M.; Mitchell, R. Heterogeneous effects of serotonin in the dorsal horn of rat: the involvement of 5-HT<sub>1</sub>-receptor subtypes. *Brain Research*, **1988**, 456, 147-158.
- [32] Zemlan, F.P.; Kow, L.M.; Pfaff, D.W. Spinal serotonin (5-HT) receptor subtypes and nociception. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1983**, 226, 477-485.
- [33] Eide, P.K.; Joly, N.M.; Hole, K. The role of spinal cord 5-HT 1A and 5-HT 1B receptors in the modulation of a spinal nociceptive reflex. *Brain Research*, **1990**, 536(1), 195-200.
- [34] Ali, Z.; Wu, G.; Kozlov, A.; Barasi, S. The actions of 5-HT 1 agonists and antagonists on nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Brain Research*, **1994**, 661(1), 83-90.
- [35] Gjerstad, J.; Tjølsen, A.; Hole, K. A dual effect of 5-HT 1B receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurons in rats. *European Journal of Pharmacology*, **1997**, 335(2), 127-132.
- [36] Liu, Z.Y.; Zhuang, D.B.; Lunderberg, T.; Yu, L.C. Involvement of 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the descending antinociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. *Neuroscience*, **2002**, 112(2), 399-407.
- [37] Hains, B.C.; Willis, W.D.; Hulsebosch, C.E. Serotonin receptors 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> reduce hyperexcitability of dorsal horn neurons after chronic spinal cord hemisection injury in rat. *Experimental Brain Research*, **2003**, 149(2), 174-186.
- [38] Bonnefont, J.; Chapuy, E.; Clottes, E.; Alloui, A.; Eschalièr, A. Spinal 5-HT 1A receptors differentially influence nociceptive processing according to the nature of the noxious stimulus in rats: effect of WAY-100635 on the antinociceptive activities of Paracetamol, Venlafaxine and 5-HT. *Pain*, **2005**, 114(3), 482-490.
- [39] Wei, H.; Pertovaara, A. 5-HT 1A receptors in endogenous regulation of neuropathic hypersensitivity in the rat. *European Journal of Pharmacology*, **2006**, 535(1), 157-165.
- [40] Pazos, A.; Cortés, R.; Palacios, J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Research*, **1985**, 346, 231-249.
- [41] Xie, H.; Dong, Z.Q.; Ma, F.; Bauer, W.R.; Wang, X.; Wu, G.C. Involvement of serotonin 2A receptors in the analgesic effect of Tramadol in mono-arthritic rats. *Brain Research*, **2008**, 1210, 76-83.
- [42] Van Steenwinckel, J.; Noghero, A.; Thibault, K.; Brisorgueil, M.J.; Fischer, J.; Conrath, M. The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is mainly expressed in nociceptive sensory neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neuroscience*, **2009**, 161(3), 838-846.
- [43] Kupers, R.; Frokjaer, V.G.; Naert, A.; Christensen, R.; Budtz-Joergensen, E.; Kehlet, H.; Knudsen, G.M. A PET [<sup>18</sup>F] altanserin study of 5-HT 2A receptor binding in the human brain and responses to painful heat stimulation. *NeuroImage*, **2009**, 44(3), 1001-1007.
- [44] Abbott, F.V.; Hong, Y.; Blier, P. Activation of 5-HT 2A receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology*, **1996**, 35(1), 99-110.
- [45] Millan, M.J.; Girardon, S.; Bervoets, K. 8-OH-DPAT-induced spontaneous tail-flicks in the rat are facilitated by the selective serotonin (5-HT) 2C agonist, RO 60-0175: blockade of its actions by the novel 5-HT 2C receptor antagonist SB 206,553. *Neuropharmacology*, **1997**, 36(4), 743-745.
- [46] Obata, H.; Saito, S.; Sasaki, M.; Goto, F. Possible involvement of a muscarinic receptor in the anti-allodynic action of a 5-HT 2 receptor agonist in rats with nerve ligation injury. *Brain Research*, **2002**, 932(1), 124-128.
- [47] Doly, S.; Madeira, A.; Fischer, J.; Brisorgueil, M.J.; Daval, G.; Bernard, R.; Conrath, M. The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons. *Journal of Comparative Neurology*, **2004**, 472(4), 496-511.
- [48] Obata, H.; Saito, S.; Sakurazawa, S.; Sasaki, M.; Usui, T.; Goto, F. Antiallodynic effects of intrathecally administered 5-HT 2C receptor agonists in rats with nerve injury. *Pain*, **2004**, 108(1), 163-169.
- [49] Nitanda, A.; Yasunami, N.; Tokumo, K.; Fujii, H.; Hirai, T.; Nishio, H. Contribution of the peripheral 5-HT 2A receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurochemistry International*, **2005**, 47(6), 394-400.
- [50] Okamoto, K.; Imbe, H.; Tashiro, A.; Kimura, A.; Donishi, T.; Tamai Y., Senba E. The role of peripheral 5HT<sub>2A</sub> and 5HT<sub>1A</sub> receptors on the orofacial formalin test in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. *Neuroscience*, **2005**, 130(2), 465-474.
- [51] Wei, H.; Chen, Y.; Hong, Y. The contribution of peripheral 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor to carrageenan-evoked hyperalgesia, inflammation and spinal Fos protein expression in the rat. *Neuroscience*, **2005**, 132(4), 1073-1082.
- [52] Kayser, V.; Elfassi, I.E.; Aubel, B.; Melfort, M.; Julius, D.; Gingrich, J.A.; Bourgoin, S. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT 1A<sup>-/-</sup>, 5-HT 1B<sup>-/-</sup>, 5-HT 2A<sup>-/-</sup>, 5-HT 3A<sup>-/-</sup> and 5-HTT<sup>-/-</sup> knock-out male mice. *Pain*, **2007**, 130(3), 235-248.
- [53] Thibault, K.; Van Steenwinckel, J.; Brisorgueil, M.J.; Fischer, J.; Hamon, M.; Calvino, B.; Conrath, M. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor involvement and Fos expression at the spinal level in Vincristine-induced neuropathy in the rat. *Pain*, **2008**, 140(2), 305-322.
- [54] Kilpatrick, G.J.; Jones, B.J.; Tyers, M.B. Identification and distribution of 5-HT 3 receptors in rat brain using radioligand binding. *Nature*, **1987**, 330, 746.
- [55] Maricq, A.V.; Peterson, A.S.; Brake, A.J.; Myers, R.M.; Julius, D. Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*, **1991**, 254(5030), 432-437.
- [56] Glaum, S.R.; Brooks, P.A.; Spyer, K.M.; Miller, R.J. 5-Hydroxytryptamine-3 receptors modulate synaptic activity in the rat nucleus tractus solitarius *in vitro*. *Brain Research*, **1992**, 589(1), 62-68.
- [57] Miquel, M.C.; Emerit, M.B.; Nosjean, A.; Simon, A.; Rumajogee, P.; Brisorgueil, M.J.; Verge, D. Differential subcellular localization of the 5-HT<sub>3</sub>-As receptor subunit in the rat central nervous system. *European Journal of Neuroscience*, **2002**, 15(3), 449-457.
- [58] van Hooft, J.A.; Vijverberg, H.P. 5-HT 3 receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story?. *Trends in Neurosciences*, **2000**, 23(12), 605-610.
- [59] Tecott, L.H.; Maricq, A.V.; Julius, D. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1993**, 90(4), 1430-1434.
- [60] Nayak, S.V.; Ronde, P.; Spier, A.D.; Lummis, S.C.R.; Nichols, R.A. Calcium changes induced by presynaptic 5-hydroxytryptamine-3 serotonin receptors on isolated terminals from various regions of the rat brain. *Neuroscience*, **1999**, 91(1), 107-117.
- [61] Morales, M.; Wang, S.D. Differential composition of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. *Journal of Neuroscience*, **2002**, 22(15), 6732-6741.
- [62] van Hooft, J.A.; Yakel, J.L. 5-HT 3 receptors in the CNS: 3B or not 3B?. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2003**, 24(4), 157-160.
- [63] Morales, M.; Battenberg, E.; de Lecea, L.; Sanna, P.P.; Bloom, F.E. Cellular and subcellular immunolocalization of the type 3 serotonin receptor in the rat central nervous system. *Molecular Brain Research*, **1996**, 36(2), 251-260.
- [64] Blandina, P.; Goldfarb, J.; Green, J.P. Activation of a 5-HT 3 receptor releases dopamine from rat striatal slice. *European Journal of Pharmacology*, **1988**, 155(3), 349-350.
- [65] Dubin, A.E.; Huvar, R.; D'Andrea, M.R.; Pyati, J.; Zhu, J.Y.; Joy, K.C.; Jackson, M.R. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT<sub>3A</sub> receptor are specifically modified by a 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunit. *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 274(43), 30799-30810.

- [66] Brüss, M.; Barann, M.; Hayer-Zillgen, M.; Eucker, T.; Göthert, M.; Bönisch, H. Modified 5-HT<sub>3A</sub> receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT<sub>3A</sub> receptor isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **2000**, 362(4-5), 392-401.
- [67] Koyama, S.; Matsumoto, N.; Kubo, C.; Akaike, N. Presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons. *Journal of Physiology*, **2000**, 529(2), 373-383.
- [68] Chameau, P.; van Hooft, J.A. Serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors in the central nervous system. *Cell and Tissue Research*, **2006**, 326(2), 573-581.
- [69] Asante, C.O.; Dickenson, A.H. Descending serotonergic facilitation mediated by spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors engages spinal Rapamycin-sensitive pathways in the rat. *Neuroscience Letters*, **2010**, 484(2), 108-112.
- [70] Alhaider, A.A.; Lei, S.Z.; Wilcox, G.L. Spinal 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *The Journal of Neurosciences*, **1991**, 11(7), 1881-1888.
- [71] Ali, Z.; Wu, G.; Kozlov, A.; Barasi, S. The role of 5HT<sub>3</sub> in nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Neuroscience Letters*, **1996**, 208(3), 203-207.
- [72] Green, G.M.; Scarth, J.; Dickenson, A. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission; state-dependent actions via dorsal horn 5-HT<sub>3</sub> receptors in the anaesthetized rat. *Pain*, **2000**, 89(1), 81-88.
- [73] Moore, K.A.; Oh, E.J.; Weinreich, D. 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate inflammation-induced unmasking of functional tachykinin responses *in vitro*. *Journal of Applied Physiology*, **2002**, 92(6), 2529-2534.
- [74] Oatway, M.A.; Chen, Y.; Weaver, L.C. The 5-HT<sub>3</sub> receptor facilitates at-level mechanical allodynia following spinal cord injury. *Pain*, **2004**, 110(1), 259-268.
- [75] Rahman, W.; Suzuki, R.; Rygh, L.J.; Dickenson, A.H. Descending serotonergic facilitation mediated through rat spinal 5HT<sub>3</sub> receptors is unaltered following carrageenan inflammation. *Neuroscience Letters*, **2004**, 361(1), 229-231.
- [76] Camilleri, M.; Boeckstaens, G. Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS. *Gut*, **2017**, 66, 966-974.
- [77] Sagalajev, B.; Bourbia, N.; Beloushko, E.; Wei, H.; Pertovaara, A. Bidirectional amygdaloid control of neuropathic hypersensitivity mediated by descending serotonergic pathways acting on spinal 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Behavioural Brain Research*, **2015**, 282, 14-24.
- [78] Bickmeyer, U.; Heine, M.; Manzke, T.; Richter, D.W. Differential modulation of I<sub>h</sub> by 5-HT receptors in mouse CA1 hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, **2002**, 16(2), 209-218.
- [79] Belenky, M.A.; Pickard, G.E. Subcellular distribution of 5-HT<sub>1b</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, **2001**, 432, 371-388.
- [80] Geurts, F.J.; De Schutter, E.; Timmermans, J.P. Localization of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **2002**, 24(1), 65-74.
- [81] Muneoka, K.T.; Takigawa, M. 5-Hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor immunoreactivity-positive 'stigmoid body'-like structure in developing rat brains. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **2003**, 21, 133-143.
- [82] Kvachnina, E.; Dumuis, A.; Wlodarczyk, J.; Renner, U.; Cochet, M.; Richter, D.W.; Ponimaskin, E. Constitutive G<sub>s</sub>-mediated, but not G<sub>12</sub>-mediated, activity of the 5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>7</sub> (a) receptor is modulated by the palmitoylation of its C-terminal domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **2009**, 1793(11), 1646-1655.
- [83] Vanhoenacker, P.; Haegeman, G.; Leysen, J.E. 5-HT<sub>7</sub> receptors: current knowledge and future prospects. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2000**, 21(2), 70-77.
- [84] Meuser, T.; Pietruck, C.; Gabriel, A.; Xie, G.X.; Lim, K.J.; Palmer, P.P. 5-HT<sub>7</sub> receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. *Life Sciences*, **2002**, 71, 2279-2289.
- [85] Matthys, A.; Haegeman, G.; Van Craenenbroeck, K.; Vanhoenacker, P. Role of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in the central nervous system: from current status to future perspectives. *Molecular Neurobiology*, **2011**, 43(3), 228-253.
- [86] Hoyer, D.; Clarke, D.E.; Fozard, J.R.; Hartig, P.R.; Martin, G.R.; Mylecharane, E.J.; Saxena, P.R.; Humphrey, P.P.A. VII. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacology Reviews*, **1994**, 46, 157-203.
- [87] Ruat, M.; Traffort, E.; Leurs, R.; Tardivel-Lacombe, J.; Diaz, J.; Arrang, J.M.; Schwartz, J.C. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) activating cAMP formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1993**, 90(18), 8547-8551.
- [88] Norum, J.H.; Hart, K.; Levy, F.O. Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT<sub>4</sub>(b) and 5-HT<sub>7</sub>(a). *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 3098-3104.
- [89] Errico, M.; Crozier, R.A.; Plummer, M.R.; Cowen, D.S. 5-HT<sub>7</sub> receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, **2001**, 102(2), 361-367.
- [90] Hedlund, P.B.; Danielson, P.E.; Thomas, E.A.; Slanina, K.; Carson, M.J.; Sutcliffe, J.G. No hypothermic response to serotonin in 5-HT<sub>7</sub> receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2003**, 100, 1375-1380.
- [91] Rocha-González, H.I.; Meneses, A.; Carlton, S.M.; Granados-Soto, V. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the formalin test. *Pain*, **2005**, 117(1), 182-192.
- [92] Dogrul, A.; Seyrek, M. Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT<sub>7</sub>, but not 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the spinal cord. *British Journal of Pharmacology*, **2006**, 149(5), 498-505.
- [93] Brenchat, A.; Romero, L.; García, M.; Pujol, M.; Burgueño, J.; Torrens, A.; Vela, J.M. 5-HT<sub>7</sub> receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *Pain*, **2009**, 141(3), 239-247.
- [94] Brenchat, A.; Nadal, X.; Romero, L.; Ovalle, S.; Muro, A.; Sánchez-Arroyos, R.; Burgueño, J. Pharmacological activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors reduces nerve injury-induced mechanical and thermal hypersensitivity. *Pain*, **2010**, 149(3), 483-494.
- [95] Amaya-Castellanos, E.; Pineda-Farías, J.B.; Castañeda-Corral, G.; Vidal-Cantú, G.C.; Murbatián, J.; Rocha-González, H.I.; Granados-Soto, V. Blockade of 5-HT<sub>7</sub> receptors reduces tactile allodynia in the rat. *Pharmacology of Biochemistry and Behavior*, **2011**, 99(4), 591-597.
- [96] Brenchat, A.; Ejarque, M.; Zamanillo, D.; Vela, J.M.; Romero, L. Potentiation of morphine analgesia by adjuvant activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Journal of Pharmacological Sciences*, **2011**, 116(4), 388-391.
- [97] Brenchat, A.; Zamanillo, D.; Hamon, M.; Romero, L.; Vela, J.M. Role of peripheral versus spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the modulation of pain under sensitizing conditions. *European Journal of Pain*, **2012**, 16(1), 72-81.
- [98] Dogrul, A.; Seyrek, M.; Akgul, E.O.; Cayci, T.; Kahraman, S.; Bolay, H. Systemic Paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors. *European Journal of Pharmacology*, **2012**, 677(1), 93-101.
- [99] Godínez-Chaparro, B.; López-Santillán, F.J.; Orduña, P.; Granados-Soto, V. Secondary mechanical allodynia and hyperalgesia depend on descending facilitation mediated by spinal 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Neuroscience*, **2012**, 222, 379-391.
- [100] Viguié, F.; Michot, B.; Kayser, V.; Bernard, J.F.; Vela, J.M.; Hamon, M.; Bourgoin, S. GABA, but not opioids, mediates the anti-hyperalgesic effects of 5-HT<sub>7</sub> receptor activation in rats suffering from neuropathic pain. *Neuropharmacology*, **2012**, 63(6), 1093-1106.



- [101] Yang, J.; Bae, H.B.; Ki, H.G.; Oh, J.M.; Kim, W.M.; Lee, H.G.; Choi, J.I. Different role of spinal 5-HT (hydroxytryptamine) 7 receptors and descending serotonergic modulation in inflammatory pain induced in formalin and carrageenan rat models. *British Journal of Anaesthesia*, **2013**, aet, 336.
- [102] Bowker, R.M.; Westlund, K.N.; Sullivan, M.C.; Coulter, J.D. Organization of descending serotonergic projections to the spinal cord. In: H.G. Kuypers and G.E. Martin (Editors). *Descending Pathways to the Spinal Cord*, Progress in Brain Research. Vol. 57. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; **1982**. pp. 239-265.
- [103] Belcher, G.; Ryall, R.W.; Schaffner, R. The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe stimulation on nociceptive and non-nociceptive dorsal horn interneurons in the cat. *Brain Research*, **1978**, 151, 307-321.
- [104] Grudt, T.J.; Williams, J.T.; Travagli, R.A. Inhibition by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in substantia gelatinosa of guinea-pig spinal trigeminal nucleus. *Journal of Physiology*, **1995**, 485, 113-120.
- [105] Hori, Y.; Endo, K.; Takahashi, T. Long-lasting synaptic facilitation induced by serotonin in superficial dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *Journal of Physiology (London)*, **1996**, 492, 867-876.
- [106] Travagli, R.A.; Williams, J.T. Endogenous monoamines inhibit glutamate transmission in the spinal trigeminal nucleus of the guinea-pig. *Journal of Physiology (London)*, **1996**, 491, 177-185.
- [107] Ito, A.; Kumamoto, E.; Takeda, M.; Shibata, K.; Sagai, H.; Yoshimura, M. Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT<sub>1A</sub>-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Journal of Neurosciences*, **2000**, 20, 6302-6308.
- [108] Lu, Y.; Perl, E.R. Selective action of noradrenaline and serotonin on neurons of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *Journal of Physiology (London)*, **2007**, 582, 127-136.



## Original article

## Antinociceptive and pronociceptive effect of levetiracetam in tonic pain model



José Luis Cortes-Altamirano<sup>a</sup>, Samuel Reyes-Long<sup>b</sup>, Adriana Olmos-Hernández<sup>c</sup>,  
Herlinda Bonilla-Jaime<sup>d</sup>, Paul Carrillo-Mora<sup>c</sup>, Cindy Bandala<sup>c</sup>, Alfonso Alfaro-Rodríguez<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> PhD Program in Biological and Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Iztapalapa-Xochimilco-Cuajimalpa, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

<sup>c</sup> Department of Neurosciences, National Rehabilitation Institute "Luis Guillermo Ibarra Ibarra" (INR) Secretaría de Salud (SSA), Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Campus Iztapalapa, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 February 2017

Received in revised form 28 August 2017

Accepted 25 September 2017

Available online 27 September 2017

## Keywords:

Levetiracetam  
Antinociceptive  
Pronociceptive  
Tonic pain  
Rat

## ABSTRACT

**Background:** Levetiracetam (LEV) is a novel anticonvulsant with proven antinociceptive properties. However, the antinociceptive and pronociceptive effect of this drug has not yet been fully elucidated in a tonic pain model.

**Methods:** Thirty-six male rats (Wistar) were randomized into six groups and underwent the formalin test as follows: rats in the control group were administered 50  $\mu$ L of 1% formalin in the paw; sham-group rats were administered 50  $\mu$ L of saline in the paw to mimic the application of formalin; the four experimental groups were administered LEV intragastrically (ig) (50, 100, 200 and 300 mg/kg), and 40 min later 50  $\mu$ L of 1% formalin was injected in the paw.

**Results:** LEV exhibited antinociceptive effect in the 300 mg/kg LEV group ( $p < 0.05$ ) and a pronociceptive effect in the 100 mg/kg LEV group ( $p < 0.05$ ) and in the 50 mg/kg LEV group ( $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** The antinociceptive and pronociceptive effect of LEV in a tonic pain model is dose-dependent.

© 2017 Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

## Introduction

The International Association for the Study of Pain (IASP) defines pain as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage” [1]. However, because of the vast complexity of this phenomenon, this definition does not cover its whole biological and chemical components. Even though pain provides us with an alarm system that allows us to recognize potential threats or dangers, when it becomes pathological (chronic pain, cancer-related pain, phantom limb pain), it becomes necessary to control the pain. Because of the complexity of pain, pain management has proven to be challenging.

Levetiracetam (LEV) is a novel antiepileptic drug (AED) that has favorable pharmacological characteristics as follows: low potential for interaction; short elimination half-life; no active metabolites, and no major negative effects on cognition [2]. LEV is mainly

employed in the treatment of epilepsy, but several studies have proved that it also possesses neuroprotective [3] and antinociceptive effect, the latter with some controversy. Researchers have tested the antinociceptive effect of LEV in an animal model for inflammatory pain with the proinflammatory compound carrageenan and have also used the model of painful diabetic neuropathy, employing the “hot-plate test” and the radiant-heat “tail-flick test” [4–8]. However, to date, the antinociceptive and pronociceptive effect have not been demonstrated in a tonic pain model.

The formalin test is a model of tonic pain that is valid and widely employed for the investigation of drugs with antinociceptive and antihyperalgesic activity [9], in addition to it being a model that has a great resemblance to clinical conditions [10]. The formalin test is different from the majority of models of pain in that it is possible to measure the way an animal responds to moderate, persistent pain caused by the injured tissue. The formalin test provides a more valid model for clinical pain than tests with phasic mechanical or thermal stimuli; further a formalin injection induces a state of tonic pain that comprises a better approximation to clinical conditions [11].

\* Corresponding author.

E-mail address: [alfa1360@yahoo.com.mx](mailto:alfa1360@yahoo.com.mx) (A. Alfaro-Rodríguez).

To date, the mechanism of action of LEV has not been fully elucidated. There is evidence that it binds to synaptic vesicle protein SV2A, where it is hypothesized to interfere with neurotransmitter release [12]. LEV has a broad spectrum of molecular targets; it inhibits neuronal hypersynchronization and inhibits N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels [13,14]. There is a lack of information on the dosage of LEV in a tonic pain model. Therefore, the main purpose of this research was to assess the antinociceptive and pronociceptive effect of LEV in a tonic pain model by using the formalin test.

## Materials and methods

Thirty-six male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (250 g) were used; the animals were maintained under controlled laboratory conditions under a 12-h light/12-h dark cycle at 22 °C and were given food and water ad libitum. The animals were treated according to the Guide for the Care and Use of Experimental Animals and under Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999.10 [15]. Similarly, all experiments complied with the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals [16].

To evaluate the antihyperalgesic effect of LEV in a tonic model of pain, the rats were divided into the following six groups: Control group ( $n=6$ ) was administered 50  $\mu\text{L}$  of a 1% formalin solution subcutaneously (sc) in the dorsal hind-paw; Sham group ( $n=6$ ) was administered 50  $\mu\text{L}$  of a saline solution through an sc injection to mimic the application of formalin; the experimental groups were treated with a single dose of LEV (Keppra™, ucb L059, (S)- $\alpha$ -ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide, UCB Pharma, Torino, Italy) each one with one dose (50, 100, 200, and 300 mg/kg). LEV was administered intragastrically (ig) through a special cannula (Gavage needle 22 g with a ball tip needle to prevent damage of the esophagus and prevent it from passing through the glottal opening into the trachea) for the rat species 40 min prior to the sc injection of 50  $\mu\text{L}$  of a 1% formalin solution.

The model for evaluating nociception employed in this study was the formalin test [17]. Rats were adapted to this test following the same procedure as the test itself 5 days before the injection of formalin. Rats were first adapted for 30 min in a cylindrical plastic chamber to allow them to become accustomed to their surroundings, and a mirror with a 45-degree angle was placed behind the chamber to allow an unimpeded view of the animals' paws. Formalin 1% (50  $\mu\text{L}$ ) was injected subcutaneously (sc) into the dorsal surface of the dorsal hind-paw of the rat with a 30-gauge

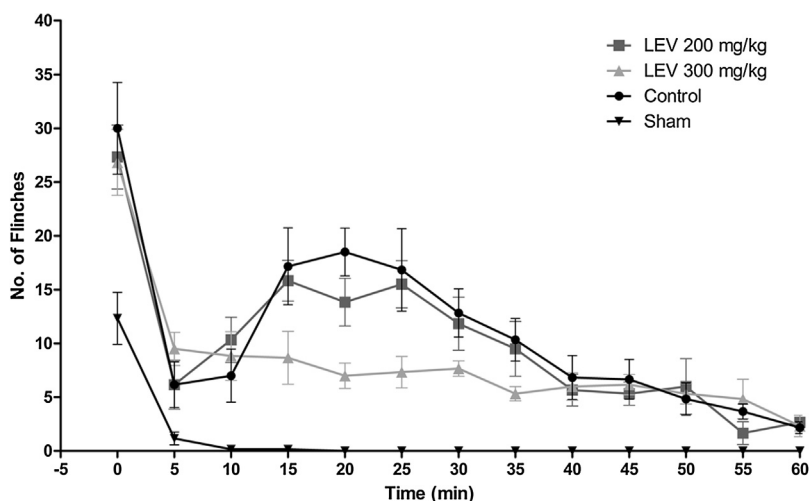
needle. The animals were then placed into the chambers, and nociceptive behavior was observed immediately after the formalin injection. Nociceptive behavior was quantified as the number of flinches of the injected paws during 1-min periods every 5 min, up to 60 min after injection. Formalin induces nociception in a biphasic manner, as previously reported [18]. These phases were defined as follows: phase 1, acute phase from 0 to 10 min, and phase 2, tonic phase from 15 to 60 min.

Normality tests were performed for all variables examined. The values obtained were expressed as mean values  $\pm$  Standard Errors of the Mean (SEM). For the time-course data, student's *t*-test was used, and for the results of the formalin test, one-way Analysis of Variance (ANOVA) was conducted and the *post-hoc* Tukey test was utilized; *p* values of  $<0.05$  were considered as statistically significant differences between the samples. Statistical analysis was performed using SPSS (ver. IBM SPSS Statistics 19.0.1, USA) statistical software.

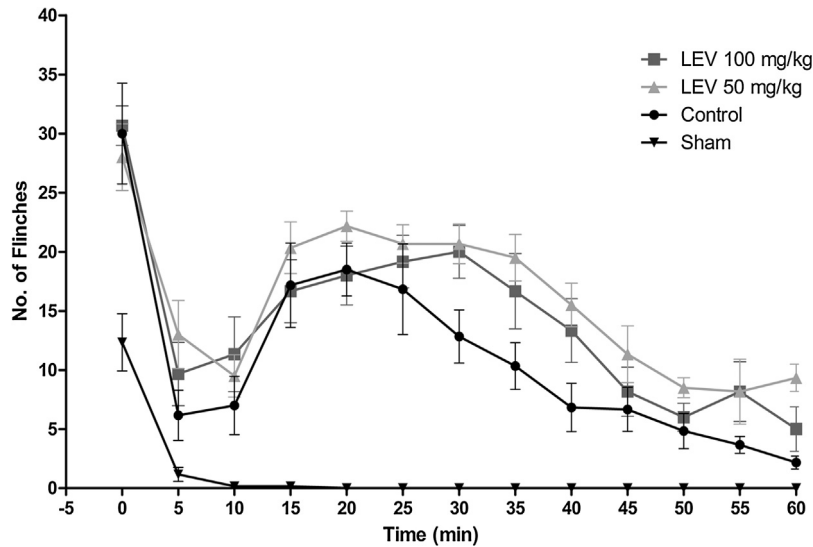
## Results

Formalin subcutaneously injected into the hind paw induces a biphasic nociceptive response. Following the formalin injection, the Control and Experimental groups demonstrated typical biphasic nociceptive responses. The Sham group showed flinches only in min 0 and 5, which shows that the nociceptive responses were caused by the formalin instead of the puncture of the needle. Figs. 1 and 2 depict the typical curves of the formalin test; the X-axis illustrates the minutes registered and the Y-axis shows the number of flinches recorded. Fig. 1 shows the higher doses employed in this study (200 and 300 mg/kg); when comparing each minute by student's *t*-test, significant differences were found between the Control group and LEV 300 mg/kg group at minutes 20 ( $p < 0.01$ ), 25 ( $p < 0.05$ ), and 35 ( $p < 0.05$ ); significant differences were also found between LEV 200 mg/kg and LEV 300 mg/kg at minutes 15 ( $p < 0.05$ ), 20 ( $p < 0.05$ ) and 25 ( $p < 0.05$ ). The curves presented by the lower doses employed in this study (50 and 100 mg/kg) are depicted in Fig. 2; significant differences were found between the Control group and LEV 50 mg/kg group in minutes 30 ( $p < 0.05$ ), 35 ( $p < 0.01$ ), 40 ( $p < 0.01$ ), 50 ( $p < 0.05$ ) and 60 ( $p < 0.01$ ); significant differences were also found between the Control group and LEV 100 mg/kg only in minute 30 ( $p < 0.05$ ).

Fig. 3 shows the cumulative flinches recorded for each group separated in Phase 1 (0–10 min) and Phase 2 (15–60 min) in the



**Fig. 1.** Effect of high doses (300 and 200 mg/kg) of Levetiracetam (ig) on paw flinches induced by injection of 1% formalin. The curves were constructed by plotting the mean of the nociceptive response (flinches) every 5 min for 60 min ( $n = 6$  per group). Data analyzed by Student's *t*-tests and are expressed as Mean  $\pm$  Standard Errors of the Mean (SEM).



**Fig. 2.** Effect of low doses (100 and 50 mg/kg) of Levetiracetam (*ig*) on paw flinches induced by injection of 1% formalin. The curves were constructed by plotting the mean of the nociceptive response (flinches) every 5 min for 60 min ( $n = 6$  per group). Data analyzed by Student's *t*-tests and are expressed as Mean  $\pm$  Standard Errors of the Mean (SEM).

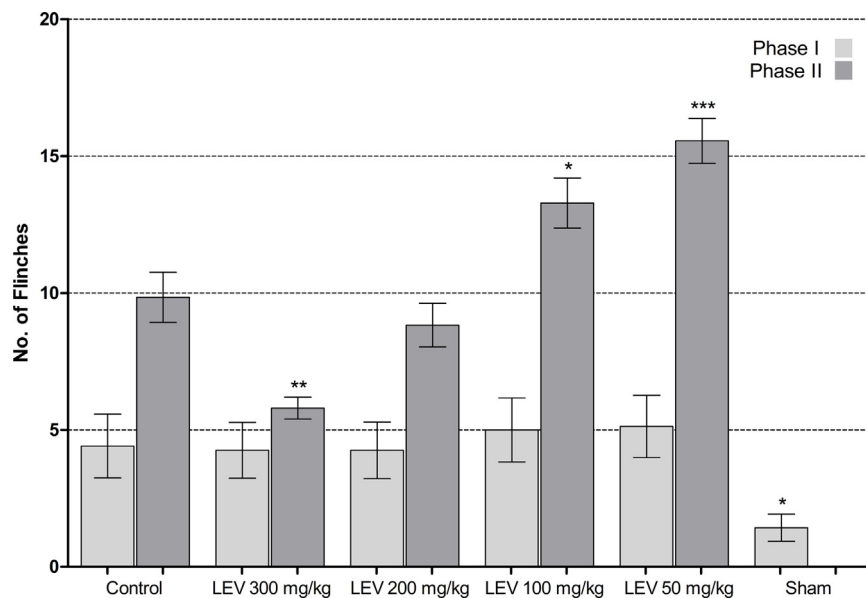
ascending order. By using one-way ANOVA, significant differences were found in Phase I ( $F = 3.95$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.05$ ). A significant decrease was found only in the Sham group ( $p < 0.05$ ). One-way ANOVA revealed significant differences in Phase II ( $F = 58.21$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.001$ ). The administration of LEV 300 mg/kg significantly reduced cumulative flinches ( $p < 0.01$ ); LEV 200 mg/kg did not show significant differences when compared to the Control group; LEV 100 and 50 mg/kg both significantly augmented cumulative flinches ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  respectively), and the Sham group presented zero flinches ( $p < 0.001$ ).

## Discussion

The aim of this study was to assess the antinociceptive and pronociceptive effect of LEV when administered *ig* in a tonic pain

model. Our results showed both an antinociceptive effect in a 300 mg/kg LEV and a pronociceptive effect in a 100 mg/kg and 50 mg/kg of LEV when we administered LEV *ig* in a model of persistent pain, while a dose of 200 mg/kg of LEV showed no difference from the Control group.

Micov et al. [5] reported the antihyperalgesic effect of LEV in rats subjected to the inflammatory pain model at doses of 200 mg/kg of LEV. In our study, we did not find antinociceptive effects at this dose due to the model and the duration of the test, in that the authors found that antihyperalgesic effects were observed at 120 min of the test. Strolin Benedetti et al. [19] conducted a study in which LEV pharmacokinetics and metabolism in mouse, rat, rabbit, and dog after a single oral dose were investigated. The authors reported that the  $C_{max}$  (54.7  $\mu\text{g/ml}$ ) of this drug in male rats was observed at 40 min of oral administration at a dose of



**Fig. 3.** Comparison of the cumulative flinches of the animals per group per phase in the formalin test. Phase 1 begins immediately after the injection of formalin (0–15 min); significant differences were found only in the Sham group. Phase 2 comprised minutes 20 to 60. Levetiracetam (*ig*) at 300 mg/kg significantly reduced the nociceptive response (flinches); when administered at lower doses (100 and 50 mg/kg) it increased the number of flinches ( $n = 6$  per group) (vs. Control,  $F = 58.21$ ,  $df = 5$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). Data are presented in the ascending order as Mean  $\pm$  Standard Errors of the Mean (SEM) and are analyzed by one-way ANOVA.

54 mg/kg. This fact is very important when designing the experimental phase; we waited 40 min after administration to ensure that the drug was present in the brain and to ensure that it could exert the antinociceptive or pronociceptive effect on the Central Nervous System (CNS). Micov et al. [8] proposed that the antihyperalgesic effect of LEV is modulated by  $\alpha_2$ -adrenoceptors, GABAA, opioids, and finally, by the 5-HT<sub>1</sub> receptor. Serotonin (5-HT) pathways exert an inhibitory (descending inhibition) or facilitator (descending facilitation) influence on the spinal processing of nociceptive input, depending on acute or chronic pain states and the type of receptor acted upon [20–22]. However, 5-HT modulates spinal nociceptive transmission in a complex manner, employing the involvement of multiple 5-HT receptor subtypes and their specific localization in the CNS [23]. 5-HT<sub>1</sub> family receptors are present in the whole spinal cord and in the grey matter in all the areas examined, and it is the major class of 5-HT receptor found in the dorsal horn [24,25]. Eide et al. [26] examined whether the administration of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists in mice could alter the tail-flick reflex and whether the effects on reflex latency involve changes in tail-skin temperature; the authors found that in the mouse, both 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists inhibit the nociceptive tail-flick reflex when injected into the spinal subarachnoid space, and that the effect does not depend on changes in tail-skin temperature.

We think that perhaps 5-HT<sub>1</sub> receptors participate in the antinociceptive modulation of LEV at high doses. Zhang et al. [27] reported that the excitability of dorsal horn neurons and the sensitivity of the neurons to intrathecal 5-HT<sub>1</sub> receptor agonists might increase following the inflammation model. The authors used an intraplantar injection of carrageenan, which presents a rapid onset and a resolution of inflammation that provokes a restricted distribution of hyperalgesia. However, Sasaki et al. [28] determined which of the spinal 5-HT receptors subtypes were involved in modulating nociceptive transmission in the formalin test to better understand the pharmacological mechanisms of 5-HT-induced antinociception. Their results showed that the 5-HT<sub>2</sub> agonist DOI (10, 30, and 100  $\mu$ g) reduced the nociceptive behavior of the formalin-injected limb in both phases 1 and 2 in a dose-dependent manner.

In the present study, low doses of 100 and 50 mg/kg of LEV have demonstrated a pronociceptive effect up to 100 min after *ig* administration. To our knowledge, this is the first report of such activity; nevertheless, in the results obtained by Tomic et al. in the same model of formalin induced pain, the total number of flinches recorded in animals under a dose of 50 mg/kg was greater than those of the Control group. Even though there was no significant difference between these two groups, this and our results are similar, and the differences may arise due to the variations in the model employed. We think that these effects are modulated by 5-HT, but for another class of receptors. For example, 5-HT facilitates persistent pain-like states through the activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors, probably due to an increased descending serotonergic drive from higher centers in the brain and, in particular, the rostral ventromedial medulla [29]. The 5HT<sub>3</sub> receptor is a ligand-gated ion channel that, when activated, causes fast depolarizing responses in neurons [30]. Activation of the 5-HT<sub>3</sub> receptor opens the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor, which becomes permeable preferentially to Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, but also to Ca<sup>2+</sup> and other cations, including the organic cation guanidinium [31]. Sagalajev et al. [32] suggests that spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors mediated the CeA-induced increase in neuropathic hypersensitivity.

Administration of agonists or antagonists to 5-HT receptors in pain models demonstrated an anti- or pronociceptive effect; this effect depends, first, on the drug dose used in all the receptors, and likewise, on the model of pain, the route of administration, and finally, on the duration of the pain. All these factors modulate the

pain when we refer to 5-HT receptors. In this particular case, LEV has been widely employed in various pathologies in the CNS; however, to date, the mechanism of action of this drug is not yet fully understood. LEV proved to exert antinociceptive and pronociceptive effects in animals subjected to the tonic pain model. We propose that the antinociceptive and pronociceptive effect is modulated in part by 5-HT receptors in the CNS. The dose, the administration route, and the pharmacokinetic parameters of LEV are important to bear in mind when elucidating the mechanism of action of this drug; this will enable to clarify the possible nociceptive pathways involved in the pharmacodynamics of LEV.

## Conclusion

The antinociceptive effect in a tonic pain model is observed at doses of 300 mg/kg, which represents a high dose in clinical practice, and the pronociceptive effect of LEV is observed at low doses of 100 and 50 mg/kg, while at the dose of 200 mg/kg, there was no difference from the effect observed in the Control group.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest with any person or any organization.

## References

- [1] Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain* 2008;137:473–7.
- [2] Cortes Altamirano JL, Olmos Hernández A, Bonilla Jaime H, Bandala C, González Maciel A, Alfaro Rodríguez A. Levetiracetam as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug. *Neurol India* 2016;64(6):1266–75.
- [3] Shetty AK. Prospects of Levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. *Front Neurol* 2013;4:1–6.
- [4] Archer DP, Lamberty Y, Wang B, Davis MJ, Samanani N, Roth SH. Levetiracetam reduces anesthetic-induced hyperalgesia in rats. *Anesth Analg* 2006;104(1):180–5.
- [5] Micov A, Tomic M, Popovic B, Stepanovic-Petrovic R. The antihyperalgesic effect of Levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: mechanism of action. *Br J Clin Pharmacol* 2010;161:384–92.
- [6] Ozcan M, Ayar A, Canpolat S, Kutlu S. Antinociceptive efficacy of Levetiracetam in a mice model for painful diabetic neuropathy. *Acta Anaesth Scand* 2008;52:926–30.
- [7] Stepanovic-Petrovic RM, Micov A, Tomic M, Ugresic ND. The local peripheral antihyperalgesic effect of Levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth Analg* 2012;115:1457–66.
- [8] Micov A, Tomic M, Pecikoza U, Ugresic N, Stepanovic-Petrovic R. Levetiracetam synergises with common analgesics in producing antinociception in a mouse model of painful diabetic neuropathy. *Pharmacol Res* 2015;97:131–42.
- [9] Masocha W, Kombian SB, Eadafioho IO. Evaluation of the antinociceptive activities of enaminone compounds on the formalin and hot plate tests in mice. *Sci Rep* 2016;6:21582.
- [10] McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett* 1996;208:45–8.
- [11] Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51(1):5–17.
- [12] Kaminski RM, Gillard M, Leclercq K, Hanon E, Lorent G, Dassel D, et al. Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of Levetiracetam. *Epilepsia* 2009;50:1729–40.
- [13] Margineanu DG, Matagne A, Kaminski RM, Klitgaard H. Effects of chronic treatment with Levetiracetam on hippocampal field responses after Pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res Bull* 2008;77:282–5.
- [14] Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2001;306:5–8.
- [15] Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999 NOM-062-ZOO-1999.
- [16] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109–10.
- [17] Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of Morphine, Meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1978;4:161–74.
- [18] Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991;104(1):35–44.
- [19] Strolin Benedetti M, Coupez R, Whomsley R, Nicolas JM, Collart P, Baltes E. Comparative pharmacokinetics and metabolism of Levetiracetam, a new anti-

- epileptic agent, in mouse, rat, rabbit and dog. *Xenobiotica* 2004;34(3):281–300.
- [20] Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 2000;86(1):11–8.
- [21] Jeong CY, Choi JI, Yoon MH. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *Eur J Pharmacol* 2004;502(3):205–11.
- [22] Dogrul A, Ossipov MH, Porreca F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res* 2009;1280:52–9.
- [23] Jeong HJ, Mitchell VA, Vaughan CW. Role of 5-HT1 receptor subtypes in the modulation of pain and synaptic transmission in rat spinal superficial dorsal horn. *Brit J Pharmacol* 2012;165(6):1956–65.
- [24] Zemlan FP, Schwab EF. Characterization of a novel serotonin receptor subtype (5-HT1S) in rat CNS: Interaction with a GTP binding protein. *J Neurochem* 1991;5:2092–9.
- [25] Murphy RM, Zemlan FP. Selective serotonin 1A/1B agonists differentially affect spinal nociceptive reflexes. *Neuropharmacology* 1990;29:463–8.
- [26] Eide PK, Joly NM, Hole K. The role of spinal cord 5-HT 1A and 5-HT 1B receptors in the modulation of a spinal nociceptive reflex. *Brain Res* 1990;536(1):195–200.
- [27] Zhang YQ, Gao X, Ji GC, Wu GC. Expression of 5-HT 2A receptor mRNA in rat spinal dorsal horn and some nuclei of brainstem after peripheral inflammation. *Brain Res* 2001;900(1):146–51.
- [28] Sasaki M, Ishizaki K, Obata H, Goto F. Effects of 5-HT 2 and 5-HT 3 receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. *Eur J Pharmacol* 2001;424(1):45–52.
- [29] Asante CO, Dickenson AH. Descending serotonergic facilitation mediated by spinal 5-HT3 receptors engages spinal rapamycin-sensitive pathways in the rat. *Neurosci Lett* 2010;484(2):108–12.
- [30] Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991;254(5030):432–7.
- [31] Brüss M, Barann M, Hayer-Zillgen M, Eucker T, Göthert M, Bönisch H. Modified 5-HT3A receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT3A receptor isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362(4–5):392–401.
- [32] Sagalajev B, Bourbia N, Beloushko E, Wei H, Pertovaara A. Bidirectional amygdaloid control of neuropathic hypersensitivity mediated by descending serotonergic pathways acting on spinal 5-HT 3 and 5-HT 1A receptors. *Behav Brain Res* 2015;282:14–24.



**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD del alumno JOSE LUIS CORTES ALTAMIRANO, matrícula 2161801085, quien cumplió con los 200 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 60 créditos de TRABAJO ACEPTADO PARA SU PUBLICACION SOBRE LA MISMA TESIS y 30 créditos de PREEXAMEN DOCTORAL. Con fecha veinticinco de mayo del 2018 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

EFFECTO DEL LEVETIRACETAM EN LA RESPUESTA NOCICEPTIVA SOBRE LOS RECEPTORES 5-HT1A y 5-HT7 EN TÁLAMO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MODULACIÓN DEL DOLOR

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 90 créditos y el programa consta de 360 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobado

**JURADO**

**Presidenta**



DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

**Secretario**



DR. ALFONSO BENITO ALFARO RODRIGUEZ

**Vocal**



DR. ANTONIO BUENO NAVA

**Vocal**



DR. PAUL CARRILLO MORA

**Vocal**



DRA. DENISE CLAVIJO CORNEJO

EFFECTO DEL LEVETIRACETAM EN LA RESPUESTA NOCICEPTIVA SOBRE LOS RECEPTORES 5-HT1A y 5-HT7 EN TÁLAMO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MODULACIÓN DEL DOLOR

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 25 del mes de mayo del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME  
DR. ANTONIO BUENO NAVA  
DR. PAUL CARRILLO MORA  
DRA. DENISE CLAVIJO CORNEJO  
DR. ALFONSO BENITO ALFARO RODRIGUEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JOSE LUIS CORTES ALTAMIRANO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JOSE LUIS CORTES ALTAMIRANO  
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

VOCAL

DR. ANTONIO BUENO NAVA

VOCAL

DR. PAUL CARRILLO MORA

VOCAL

DRA. DENISE CLAVIJO CORNEJO

SECRETARIO

DR. ALFONSO BENITO ALFARO RODRIGUEZ