

El aumento en la noradrenalina espinal como mayor contribuyente al efecto antihiperalgésico de antidepresivos luego de la lesión de nervio periférico en la rata

An increase in spinal cord noradrenaline is a major contributor to the antihyperalgesic effect of antidepressants after peripheral nerve injury in the rat

Artículo publicado originalmente en la Revista PAIN 153 (2012) 990–997

Kunie Nakajima MD, Hideaki Obata MD, Nobuhisa Iriuchijima MD, Shigeru Saito MD

Departamento de Anestesiología, Universidad de Gunma, Escuela de Graduados de Medicina, Gunma, Japón
Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés en la publicación de estos datos.

RESUMEN

Los antidepresivos a menudo son utilizados para el tratamiento del dolor neuropático. Los estudios clínicos sugieren que la eficacia de los inhibidores de la recaptación de serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA) (IRSN) para el dolor neuropático es mayor que aquella de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS).

En el presente estudio, determinamos la eficacia y los mecanismos involucrados en los efectos antihiperalgésicos del milnaciprán, un IRSN, comparado con paroxetina, un ISRS, y maprotilina, un inhibidor selectivo de la recaptación de la NA, utilizando un modelo de rata de dolor neuropático. Las ratas macho de tipo Sprague-Dawley fueron sometidas a ligadura del nervio espinal (LNE), y se midió el umbral de retirada a la presión de la pata. La inyección de milnaciprán (3–30 mg/kg) produjo un efecto antihiperalgésico dosis-dependiente. Dicho efecto se revirtió mediante la inyección intratecal del antagonista del adrenoreceptor α_2 , idazoxan (30 μ g), pero no mediante antagonistas del receptor de 5-HT. La paroxetina produjo un efecto antihiperalgésico solo a la dosis máxima probada (10 mg/kg). Este efecto fue revertido por la inyección intratecal tanto de idazoxan como de ondansetrón (30 μ g), un antagonista del receptor 5-HT₃. La maprotilina produjo un efecto antihiperalgésico (10 y 30 mg/kg), y este efecto fue revertido por idazoxan intratecal. En estudios de microdiálisis, las concentraciones de NA y 5-HT en el asta dorsal espinal, se incrementaron después de la inyección de milnaciprán o paroxetina, indistintamente, y sólo la NA se incrementó luego de la inyección de maprotilina. Además, el contenido de NA en la médula espinal de ratas con LNE fue mayor que en los animales normales. Estos hallazgos sugieren que el incremento de NA en la médula espinal juega un papel importante en los efectos antihiperalgésicos de no solamente los inhibidores de la recaptación de NA, sino también de los ISRS.

Palabras clave: antidepresivos; dolor neuropático; médula espinal; noradrenalina

ABSTRACT

Antidepressants are often used for the treatment of neuropathic pain. Clinical studies suggest that the efficacy of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake inhibitors (SNRIs) for neuropathic pain is greater than that of selective 5-HT reuptake inhibitors (SSRIs). In the present study, we determined the efficacy and mechanisms involved in the antihyperalgesic effects of milnacipran, an SNRI, compared with paroxetine, an SSRI, and maprotiline, a selective NA reuptake inhibitor, using a rat model of neuropathic pain. Male Sprague-Dawley rats underwent spinal nerve ligation (SNL), and the withdrawal threshold to paw pressure was measured. Intraperitoneal injection of milnacipran (3–30 mg/kg) produced a dose-dependent antihyperalgesic effect. The effect was reversed by intrathecal injection of the α_2 -adrenoceptor antagonist idazoxan (30 μ g), but not by various 5-HT receptor antagonists. Paroxetine produced an antihyperalgesic effect only at the highest dose tested (10 mg/kg). This effect was reversed by intrathecal injection of both idazoxan and ondansetron (30 μ g), a 5-HT₃ receptor antagonist. Maprotiline produced an antihyperalgesic effect (10 and 30 mg/kg), and the effect was reversed by intrathecal idazoxan. In microdialysis studies, NA and 5-HT concentrations in the spinal dorsal horn were increased after injection of either milnacipran or paroxetine, and only NA was increased after maprotiline. Furthermore, the NA content in the spinal cord of SNL rats was greater than that in normal animals. These findings suggest that an increase in NA in the spinal cord plays an important role in the antihyperalgesic effects of not only NA reuptake inhibitors but also SSRIs.

Keywords: antidepressants; neuropathic pain; spinal cord; noradrenaline

Correspondencia: Tel.: +81 27 220 8454; fax: +81 27 220 8473.
E-mail: hobata@showa.gunma-u.ac.jp (H. Obata).

INTRODUCCIÓN

La lesión de nervios periféricos conduce al dolor neuropático, el cual está asociado a varios cambios en el procesamiento sensorial desde la neurona aferente primaria a la médula espinal y a las regiones supraespinal y cortical. Los sistemas de NA y 5-HT tronco encefálico-espinal descendentes suprimen las señales nociceptivas de las neuronas primarias aferentes al asta dorsal espinal, y estos sistemas inhibitorios pueden jugar un papel importante en los estados de dolor neuropático¹. La activación de los receptores adrenérgicos espinales y de los receptores de 5-HT produce efectos antinociceptivos en varios modelos de dolor en roedores¹⁻⁴. Además, la administración intratecal de agonistas adrenérgicos y de agonistas de los receptores de 5-HT suprime la alodinia en un modelo de rata de dolor neuropático^{5,6}. Aunque también está informado que la vía de la 5-HT causa facilitación descendente luego de la lesión en nervios periféricos en roedores⁷⁻⁸, el reclutamiento de los sistemas inhibitorios descendentes monoaminérgicos podría ser un tratamiento prometedor para el dolor neuropático. Los antidepresivos son ampliamente utilizados para el tratamiento del dolor neuropático. Entre los antidepresivos, los tricíclicos (ATCs) y los inhibidores de la recaptación de NA y serotonina (IRNS) se consideran las drogas de primera línea para el tratamiento del dolor neuropático⁹. Aunque los antidepresivos pueden inhibir el dolor neuropático en la médula espinal mediante el bloqueo de la recaptación de 5-HT y de NA, los mecanismos de los efectos nociceptivos de los ATCs son complejos¹⁰⁻¹³. Por ejemplo, los ATCs activan el sistema opioidérgico endógeno, así como también los receptores GABA-B y adenosina A1. También bloquean varios canales iónicos y la mayoría de los ATCs tienen afinidad por múltiples receptores, incluyendo a los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). En contraste, los IRNSs inhiben selectivamente la recaptación de NA y 5-HT sin una afinidad relevante por algún otro tipo de receptor o canales iónicos¹³. Un IRNS representativo es el milnaciprán¹⁴. La hipótesis de la inhibición de la recaptación de NA y el subsecuente aumento de NA en la médula espinal tuvo un rol clave en la supresión del dolor neuropático mediante antidepresivos, debido a que la eficacia de los ISRSs para el tratamiento del dolor neuropático es menor que la de los IRSNs y los ATCs^{13,15,16}. Para probar esta hipótesis, se investigaron los mecanismos de los efectos antihiperálgicos del milnaciprán utilizando un modelo de rata de dolor neuropático, en primer lugar mediante la definición de qué receptores están involucrados en los efectos antihiperálgicos producidos por milnaciprán en la médula espinal y luego, evaluando el aumento de los niveles de NA y 5-HT en el asta dorsal de la médula espinal después de la inyección de milnaciprán utilizando microdiálisis. Además se realizaron estos estudios utilizando paroxetina, un ISRS, y maprotilina, un

inhibidor selectivo de la recaptación de NA, a los fines de comparar la eficacia y los mecanismos de los efectos antihiperálgicos de milnaciprán. Farmacológicamente, el milnaciprán bloquea la recaptación de NA y de 5-HT con una afinidad casi igual^{14,17,18}, la paroxetina tiene una alta selectividad para la inhibición de la recaptación de 5-HT, y la maprotilina tiene una elevada selectividad para la inhibición de la recaptación de NA¹⁴; por lo tanto, el uso de estas drogas juntas en el presente estudio permite la determinación de los papeles relativos de la señalización noradrenérgica y serotoninérgica en los efectos antihiperálgicos de los antidepresivos.

MÉTODO

Animales

Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales, de la Escuela de Graduados de Medicina de la Universidad de Gunma. Se utilizaron en todos los experimentos ratas macho de tipo Sprague-Dawley (200-250 g). Los animales fueron sometidos a un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad con libre acceso al agua y a la comida. Al finalizar el estudio, todos los animales fueron sacrificados mediante una dosis de pentobarbital. La ligadura de nervio espinal (LNE) se realizó como fue descrita previamente¹⁹. En breve, los animales fueron anestesiados con isoflurano por inhalación (2%) en oxígeno, se han expuesto las láminas laterales de las vértebras lumbares bajas y sacras altas, se removió el proceso transversal derecho de L6 y los nervios espinales derechos L5 y L6 fueron identificados y ligados fuertemente utilizando hilo de sutura de seda 5-0. Posteriormente se procedió a cerrar la herida. Una semana después de la LNE, se insertó un catéter intratecal para la administración de drogas. Se insertó un catéter esterilizado de polietileno de calibre 32 (RecathCo, Allison Park, PA) conectado a un tubo Tygon externo de 8,5 cm (Saint-Gobain Performance Plastics, Akron, OH) mientras se sometía a la rata bajo anestesia como se ha descrito previamente²⁰. Se avanzó el catéter caudalmente a 7,5 cm de la cisterna magna hasta la ampliación lumbar. Se les permitió a los animales recuperarse por siete días antes de la prueba de las drogas.

Evaluaciones del comportamiento

Quien realizó la prueba de comportamiento no conocía el fármaco ni la dosis. Se utilizó un analgesímetro (Ugo Basile, Comerio, Italy) para medir el umbral de retirada a la presión aplicada a la pata trasera, expresado en gramos, como se ha descrito previamente²¹. El dispositivo aplica una presión creciente a la pata trasera. Cuando el animal retira su pata, la presión se libera o inmediatamente y el umbral de retirada se lee e interpreta en base a una

escala. El entrenamiento del animal para este estudio fue realizado durante 3 a 5 días antes del tratamiento farmacológico. Se utilizó un punto de corte de 250 g para evitar la lesión de los tejidos. Estos animales se han utilizado 2 o 3 veces en intervalos de 4 a 5 días. Los fármacos y las dosis fueron asignados al azar.

Drogas y administración de drogas

La primera serie de experimentos se realizó para examinar el curso de los efectos antihiperálgicos en el tiempo y los efectos dosis-respuesta de la administración intraperitoneal de milnaciprán (0, 3, 10, 30 mg/kg), paroxetina (0, 1, 3, 10 mg/kg) y maprotilina (0, 3, 10, 30 mg/kg). El umbral de retirada fue determinado antes (antes de la LNE) y al tiempo 0 (antes de la inyección de las drogas) y después, a intervalos de 30 min luego de la inyección. Para la administración intraperitoneal, se inyectaron las drogas en un volumen de 1 ml. Tanto el milnaciprán como la maprotilina fueron disueltos en solución salina, y la paroxetina se disolvió en una solución de dimetilsulfóxido al 25%. La segunda serie de experimentos se realizó para determinar los efectos del tratamiento intratecal con una de las siguientes drogas: un antagonista del receptor adrenérgico α_2 , idazoxan; un antagonista de los receptores 5-HT_{1/2}, metisergida; un antagonista de los receptores 5-HT_{2A/2C}, ketanserina; y un antagonista del receptor 5-HT₃, ondansetrón. Se administraron por vía intratecal solución salina o 30 μ g de cada antagonista 30 minutos antes del efecto máximo de cada droga (60 minutos luego de la inyección de milnaciprán, 30 minutos luego de la inyección de paroxetina y simultáneamente con la inyección de maprotilina), y luego se determinó el umbral 30 minutos más tarde. Se compararon los umbrales de retirada luego de la inyección de aquellos antagonistas de los receptores, con los del grupo tratado con solución salina. La dosis del antagonista fue seleccionada en base a los resultados de un estudio previo²² y en nuestros estudios preliminares. Para la inyección intratecal, cada antagonista se disolvió en solución salina y se inyectaron en un volumen de 5 μ l, seguido de una inyección de solución salina de 10 μ l para limpiar el catéter. El milnaciprán fue una donación generosa de la Corporación Asahi Kasei (Osaka, Japón). La metisergida se adquirió del Research Biochemicals International (Natick, MA). Otras drogas fueron adquiridas de Sigma (St. Louis, MO).

Estudios de microdiálisis

Los estudios de microdiálisis se realizaron con ratas normales, como las ratas control no operadas, y con ratas

con LNE como se ha descrito previamente²³. Se indujo la anestesia con uretano (1,2-1,5 g/kg i.p) y luego se mantuvo con isoflurano al 0,5% en oxígeno al 100% a través de un cono nasal. Se canuló la vena femoral izquierda para la infusión de fluidos o inyección de drogas. Se mantuvo la temperatura rectal a 37-38°C con una almohadilla de calefacción colocada debajo del animal. Los niveles L3 a L5 de la médula espinal fueron expuestos utilizando una laminectomía toracolumbar, y luego se colocó a la rata en un aparato estereotáctico. Después de abrir la duramadre, se levantó una raíz dorsal que ingresa a la médula espinal por encima del nivel de los sitios de registro, utilizando un refractor de vidrio, de modo que una sonda de microdiálisis pueda avanzar dentro de la capa superficial del asta dorsal. La sonda se insertó justo lateral a la raíz dorsal y avanzó en un ángulo de 15°, a una profundidad de 1 mm utilizando un micromanipulador (modelo WR-88; Narishige, Tokio, Japón). La superficie de la médula espinal se cubrió con aceite mineral. Las sondas de microdiálisis comprendían una longitud de 1 mm de membrana de diálisis cilíndrica (OD: 0,22 mm, ID: 0,20 mm), y la membrana se fijó a un tubo de doble luz de sílice de 1 cm (OD: 0,35 mm; Eicom, Kyoto, Japan). Se perfundió la sonda de microdiálisis con solución de Ringer (NaCl, 147 mmol/L; KCl, 4 mmol/L y 2.3 mmol/L de CaCl₂) a un flujo constante (1 μ l/min) utilizando una bomba de microjeringa (ESP-64; Eicom Co.). Luego de 120 minutos de perfusión constante, se tomaron 2 muestras consecutivas para determinar las concentraciones basales de NA y 5-HT en el dializado. Las ratas que fueron sometidas a LNE se utilizaron en los estudios de evolución en el tiempo. En el estudio piloto, se observó que la evolución en el tiempo del aumento en NA y 5-HT luego de la inyección de milnaciprán, fue la misma entre las inyecciones intraperitoneal e intravenosa (Figura 4, recuadro). Así, todas las drogas fueron inyectadas por vía intravenosa en los estudios de microdiálisis debido a razones técnicas (por ejemplo, la dificultad de la inyección intraperitoneal en ratas en decúbito prono en el aparato de diálisis y para permitir el aumento estable de la concentración sanguínea de las drogas, especialmente en los estudios de dosis-respuesta acumulativos). La dosis efectiva máxima de milnaciprán (30 mg/kg), paroxetina (10 mg/kg), maprotilina (10 mg/kg), o solución salina (1 ml) se administraron por vía intravenosa a través de una cánula en la vena femoral. Se realizaron además, estudios de dosis-respuesta acumulativos con milnaciprán para comparar el incremento de NA y 5-HT en ratas con LNE y control. El milnaciprán se administró por vía intravenosa, a dosis de 1, 2, 7 y 20 mg/kg (dosis acumulativas: 1, 3, 10 y 30 mg/kg) a intervalos de 30 minutos. Las fracciones perfundidas de 15 min se recogieron en un inyector automático (EAS-20; Eicom Co.), y se analizaron las concentraciones de NA y 5-HT mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección electroquímica utilizando un sistema

de análisis HTEC-500 (Eicom Co.). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: la fase móvil compuesta por 0,1 mol/L de amortiguador de acetato de amonio (pH 6,0), 0,05 mol/L de sulfonato de sodio en metanol (7:3 vol/vol) y 50 mg/L de Na₂-EDTA; y la columna fue una EICOMPAC CAX (2,0 mm - 200 mm; Eicom). El electrodo de trabajo fue un carbón vítreo (WE-3G, Eicom Co.); y una tasa de flujo de 0,25 ml/min. El voltaje del detector se estableció en 0,45 V. La temperatura del detector, en 35,0°C. El tiempo de retención para la NA fue de 5,4 minutos y para la 5-HT fue de 13,1 minutos. El límite de detección de este ensayo en el presente estudio fue de 30 fg por inyección (información de Eicom Co.).

Contenido de NA y 5-HT en la médula espinal

También se midió el contenido de NA y 5-HT en la médula espinal en ratas normales como control y en ratas con LNE como se ha descrito previamente²⁴. Las médulas espinales lumbares (L4-L6) fueron diseccionadas y divididas en mitades derecha e izquierda. Estas se pesaron y se mantuvieron en hielo. Cada médula espinal fue homogeneizada en 500 IL de 0,2 mol/L de ácido perclórico, que contiene 0,1 mmol/L de Na₂-EDTA e isoproterenol (0,02 mg/mL) como un estándar interno, y centrifugada a 20.000 g a 0°C por 15 minutos. Los sobrenadantes se mantuvieron a un pH 3,0 mediante la adición de 1 mol/L de acetato de sodio y se filtraron a través de un filtro centrífugo de un tamaño de poro de 0,45 μ m (Millipore, Bedford, MA). Las muestras (10 IL) se inyectaron en un sistema de análisis HTEC-500 (Eicom) y se analizaron las concentraciones de NA y 5-HT utilizando HPLC con detección electroquímica. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: la fase móvil compuesta por 0,1 mol/l del amortiguador fosfato (pH 6,0) que contiene 5 mg/l de Na² EDTA, 190 mg/l de ácido 1-octanesulfato de sodio y metanol al 17% y la columna fue una EICOMPAK SC-50DS (3,0 mm - 150 mm, Eicom). El límite de detección de este ensayo en el presente estudio fue de 30 fg por inyección. El electrodo de trabajo fue de carbón vítreo (WE-3G, Eicom) con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. El tiempo de retención para la NA fue de 4,43 minutos, y para la 5-HT, de 22,95 minutos. El límite de detección para este ensayo en el presente estudio fue de 30 fg por inyección (información de Eicom).

Análisis de datos y estadísticas

Se seleccionó un tamaño de muestra de 6, asumiendo una diferencia mínima significativa del 7% y una desviación estándar dentro de los grupos del 4%, basado en estudios anteriores. Los datos de los estudios de comportamiento se expresaron como el porcentaje de cambio en el umbral, donde el porcentaje de cambio en el umbral = $100 \times \frac{\text{umbral luego de la administración}}{\text{umbral antes de la administración}}$

de las drogas/umbral antes de la administración de las drogas luego de la LNE. Los datos fueron normalmente distribuidos y se presentan como media \pm SEM. Los datos de la evolución en el tiempo fueron analizados utilizando un análisis de 2 vías de diferencia (ANOVA), seguido por un Student-Newman-Keuls POST HOC TEST para comparaciones múltiples. Las curvas de dosis-respuesta acumulativa de los estudios de microdiálisis se compararon utilizando el programa PharmToolsPro (McCary Group, Emmaus, PA). Otros datos se analizaron mediante el ANOVA de 1 vía. Se consideraron significativas las diferencias con un valor de $p < 5$.

RESULTADOS

Efectos antihiperalgésicos del milnaciprán, paroxetina y maprotilina

La ligadura del nervio espinal disminuyó el umbral de retirada de la pata trasera ipsilateral en aproximadamente un 40% (126,6 \pm 6,1 g antes de la LNE y 75,7 \pm 2,6 g después de la LNE $n = 72$). La inyección intraperitoneal de milnaciprán (3-30 mg/kg) produjo efectos antihiperalgésicos en un modo dosis-dependiente ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías), y el efecto pico se observó a los 90 minutos después de la inyección (Fig. 1A). En las ratas normales, sin embargo, la dosis más alta de milnaciprán (30 mg/kg) no afectó el umbral de retirada comparado con el grupo tratado con solución salina ($n = 6$, datos no mostrados), lo que indica que el milnaciprán podría ser eficaz sólo en un estado de dolor neuropático. La administración intratecal de idazoxan, un antagonista de los receptores adrenérgicos α_2 , revirtió el efecto antihiperalgésico (30 mg/kg) cuando se lo inyectó 30 minutos antes del pico del efecto antihiperalgésico del milnaciprán ($p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía; el umbral descendió un 27% comparado con el grupo de milnaciprán + solución salina, Fig. 1B). La inyección intratecal de antagonistas del receptor de 5-HT no revirtió el pico del efecto antihiperalgésico del milnaciprán (Fig. 1B). La inyección intraperitoneal de paroxetina produjo un efecto antihiperalgésico sólo a dosis máximas de 10 mg/kg ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías) y el efecto pico se observó 60 minutos después de la inyección (Fig. 2A). La administración intratecal de idazoxan y ondansetrón, un antagonista del receptor 5-HT₃, revirtió este efecto antihiperalgésico de la paroxetina (10 mg/kg) cuando se inyectó cada antagonista 30 minutos antes del pico del efecto antihiperalgésico ($p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía; el umbral disminuyó por un 21% y 29%, respectivamente comparado con el grupo paroxetina + solución salina; Figura 2B). La inyección intraperitoneal de maprotilina produjo un efecto antihiperalgésico a dosis de 10 y 30 mg/kg ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías), y el pico del efecto se observó 30 minutos después de la inyección (Fig. 3A). No hubo diferencia entre los grupos tratados con 10 y 30 mg/kg. La administración intratecal de idazoxán,

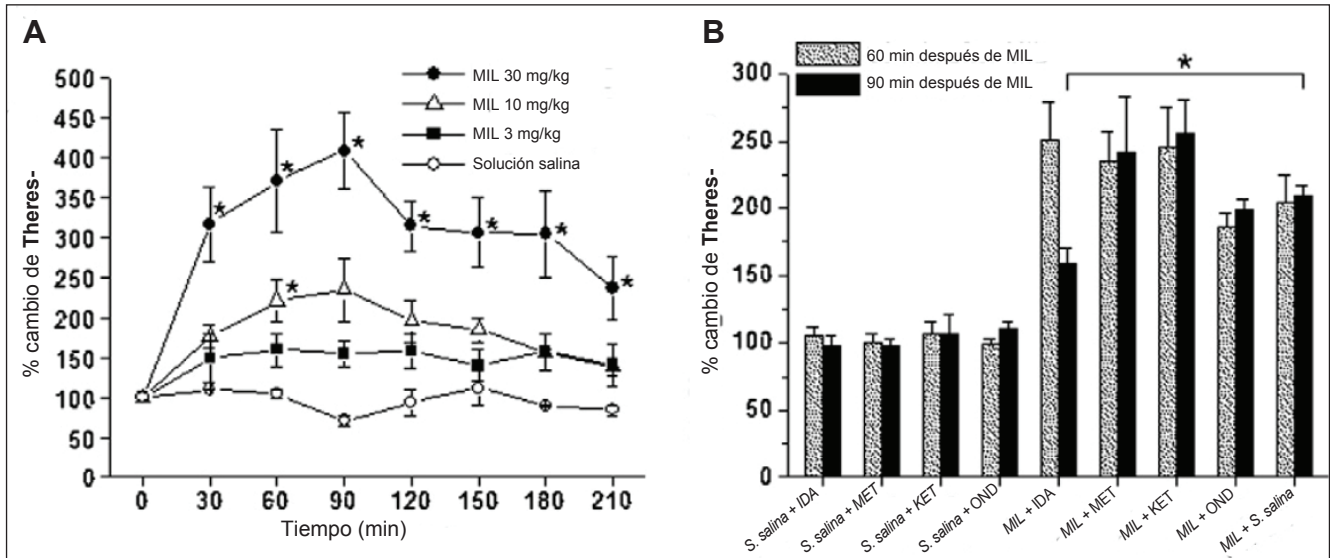


Figura 1 (A) Evolución en el tiempo del efecto antihiperalgésico de la inyección intraperitoneal de milnaciprán (MIL), un IRNS, en ratas con LNE. La inyección intraperitoneal de milnaciprán produjo un incremento dosis-dependiente (3–30 mg/kg, $p < 0,05$ por ANOVA de dos vías, $n = 6$ en cada grupo) en el umbral de retirada en comparación con el grupo tratado con solución salina. Todos los valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con solución salina. (B) Efecto de la inyección intratecal con antagonistas de los receptores adrenérgicos α_2 y receptores de 5-HT en el efecto antihiperalgésico de 30 mg/kg de milnaciprán. Después de determinar el umbral 60 minutos luego de la inyección de milnaciprán (60 min después de MIL), las ratas recibieron la administración intratecal de 30 μ g de idazoxan (IDA), un antagonista del adrenoceptor α_2 ; 30 μ g de metisergida (MET), un agonista del receptor 5-HT $_{1/2}$; 30 μ g de ketanserina (KET), un antagonista del receptor 5-HT $_{2A/2C}$; 30 μ g de ondansetrón (OND), un antagonista del receptor 5-HT $_3$; o solución salina, y luego se determinó el umbral 30 minutos más tarde (90 min luego de MIL). Todos los valores representan una media \pm SEM para 6 ratas. $p < .05$ entre los dos grupos.

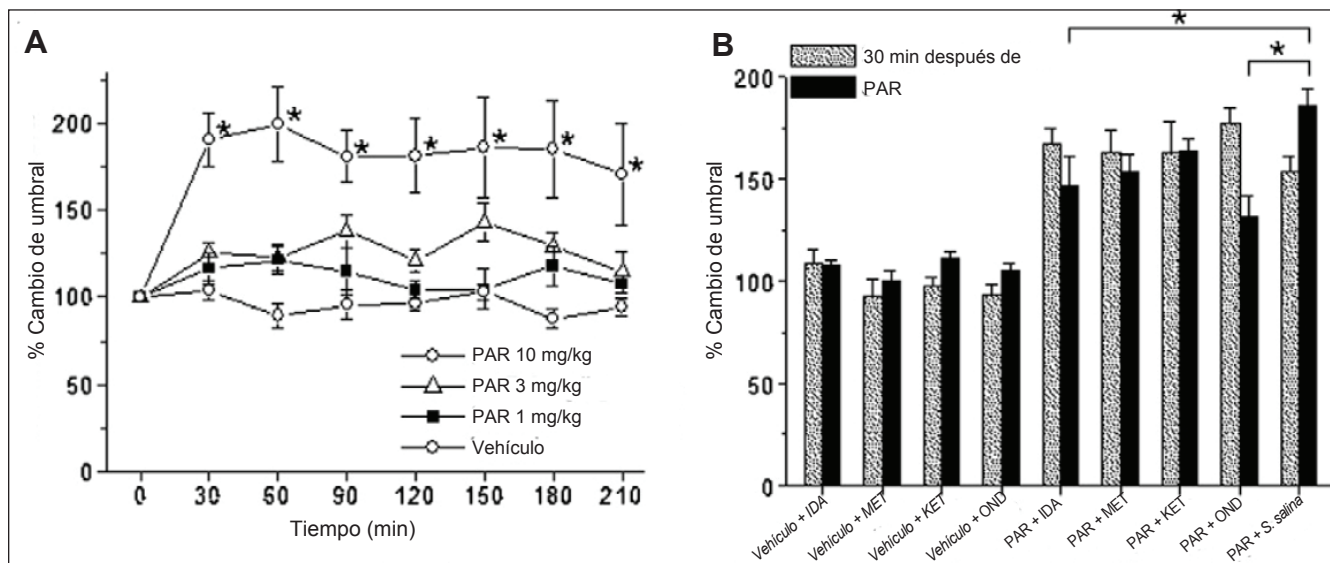


Figura 2. (A) Evolución en el tiempo del efecto antihiperalgésico de la inyección intraperitoneal de paroxetina (PAR), un ISRS, en ratas con LNE. La inyección intraperitoneal de paroxetina produjo un efecto antihiperalgésico en la dosis más alta (10 mg/kg, $p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías, $n = 6$ en cada grupo) en el umbral de retirada en comparación con el grupo tratado con vehículo. (B) Efecto de la inyección intratecal con antagonistas del adrenoceptor α_2 y del receptor de 5-HT en el efecto antihiperalgésico de 10 mg/kg de paroxetina. Luego de determinar el umbral 30 minutos después de la inyección de paroxetina (30 minutos después de PAR), las ratas recibieron la administración intratecal de 30 μ g de idazoxan (IDA), un antagonista del adrenoceptor α_2 ; 30 μ g de metisergida (MET), un agonista del receptor 5-HT $_{1/2}$; 30 μ g de ketanserina (KET), un antagonista del receptor 5-HT $_{2A/2C}$; 30 μ g de ondansetrón (OND), un antagonista del receptor 5-HT $_3$; o solución salina y se determinó el umbral 30 minutos después (60 min después de PAR). Todos los valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. $p < 0,05$ entre los 2 grupos.

pero no de antagonistas del receptor de 5-HT, revirtió este efecto antihiperálgico de la maprotilina (10 mg/kg) en una inyección de 30 minutos anterior al pico del efecto antihiperálgico ($p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía comparado con el grupo tratado con maprotilina + solución salina, el umbral disminuyó un 36%, (Figura 3B). La administración intraperitoneal de milnaciprán, paroxetina y maprotilina en las dosis utilizadas en los estudios del comportamiento no produjeron ningún efecto adverso. Un informe anterior también evidenció que la administración intraperitoneal de milnaciprán de 60 mg/kg no mostró ningún efecto adverso²⁵. No se han utilizado tampoco 30 mg/kg de paroxetina debido a que esta dosis ha producido un efecto adverso severo (convulsiones). La administración intratecal de cada antagonista por separado a la misma dosis utilizada en este estudio no alteró el umbral de retirada (Figs. 1B, 2B, y 3B).

Aumento de los niveles de NA y 5-HT en la médula espinal luego de la inyección de milnaciprán, paroxetina y maprotilina basado en la microdialísis

La figura 4 muestra la evolución en el tiempo de la variación en porcentaje de la concentración de NA y 5-HT en el asta dorsal de la médula espinal en ratas con LNE luego de la inyección de milnaciprán. Como se ha descrito en Métodos, los cambios en la evolución en el tiempo de NA y 5-HT fueron similares luego de la inyección intravenosa e intraperitoneal de milnaciprán (30 mg/kg; (Fig. 4, recua-

dro). Por lo tanto, todos los fármacos se inyectaron por vía intravenosa en los estudios de microdialísis. Luego de la inyección de milnaciprán (30 mg/kg), se incrementaron tanto la NA como la 5-HT ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías). Las concentraciones de NA aumentaron en 30 minutos y alcanzaron aproximadamente el 500% del valor basal a las 2 horas y el aumento continuó por más de 6 horas luego de la inyección (no se muestra la información). La concentración de 5-HT también se incrementó, pero alcanzó su pico máximo 45 minutos después de la inyección y luego disminuyó gradualmente dentro de las 2 horas. En el grupo tratado con solución salina, las concentraciones de NA y de 5-HT en los dializados no variaron a lo largo del tiempo. El estudio de dosis-respuesta acumulativo con milnaciprán se muestra en la figura 5. La concentración de NA aumentó de manera dosis-dependiente tanto en ratas normales como en ratas con LNE ($p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía; figura 5A). El aumento de la NA fue mayor en ratas con LNE que en las ratas normales luego de la inyección de milnaciprán a dosis de 1 a 30 mg/kg ($p < 0,05$ comparado por PharmToolsPro). La concentración de NA en ratas con LNE fue mayor que en las ratas normales a 3 mg/kg ($0,119 \pm 0,012$ pg/L en ratas con LNE, y $0,067 \pm 0,005$ pg/L en ratas normales, respectivamente, $p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía) y 10 mg/kg ($0,188 \pm 0,023$ pg/L en ratas con LNE, y $0,120 \pm 0,016$ pg/L en ratas normales, respectivamente, $p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía). La concentración de NA en ratas con LNE se incrementó en aproximadamente un 350%

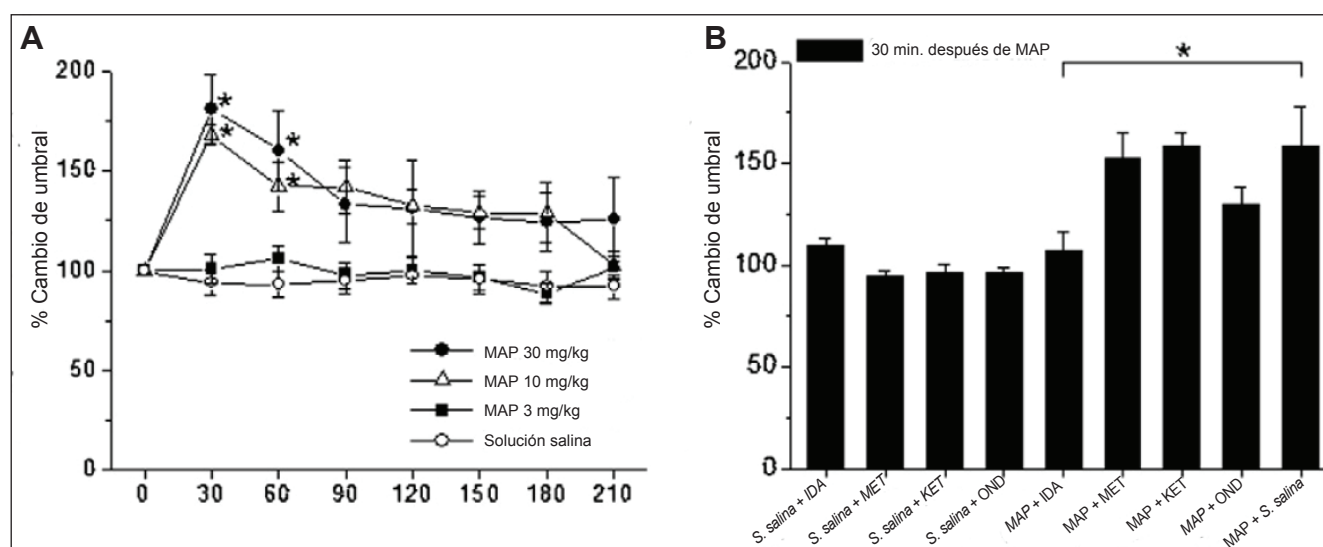


Figura 3. (A) Evolución en el tiempo del efecto antihiperálgico de la inyección intraperitoneal de maprotilina (MAP), un inhibidor selectivo de la recaptación de NA, en ratas con LNE. La inyección intraperitoneal de maprotilina (10 y 30 mg/kg) produjo un efecto antihiperálgico ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías, $n = 6$ en cada grupo) en el umbral de retirada en comparación con el grupo tratado con solución salina. Todos los valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con solución salina. (B) Efecto de la inyección intratecal de antagonistas del adrenoreceptor α_2 y del receptor de 5-HT en el efecto antihiperálgico de 10 mg/kg de maprotilina. Después de determinar el umbral, las ratas recibieron la administración intratecal de 30 μ g de idazoxan (IDA), un antagonista del adrenoreceptor α_2 ; 30 μ g de ketanserina (KET), un antagonista de los receptores 5-HT_{2A/2C}; 30 μ g de metisergida (MET), un agonista de los receptores 5-HT_{1/2}; 30 μ g de ondansetrón (OND), un antagonista del receptor 5-HT₃; o solución salina simultáneamente con una inyección de maprotilina y se determinó el umbral 30 minutos después. Todos estos valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. $p < 0,05$ entre los dos grupos.

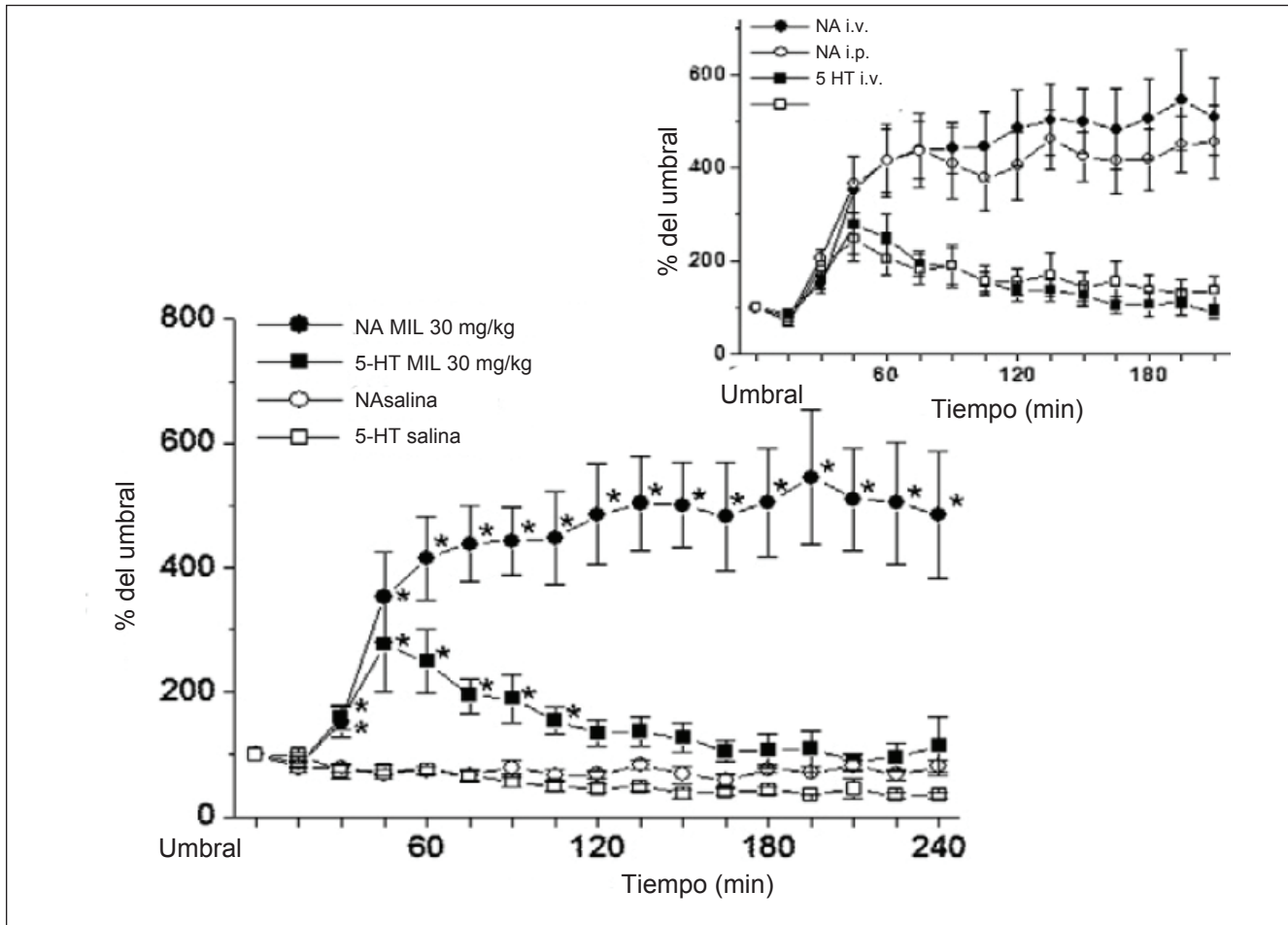


Figura 4. Estudios de microdiálisis para NA y 5-HT después de la inyección de milnaciprán en el asta dorsal de la médula espinal lumbar. Ratas con LNE que han recibido solución salina intravenosa o milnaciprán (MIL, 30 mg/kg). Tanto la NA como la 5-HT se han incrementado después de la inyección ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías). Un aumento similar en NA y 5-HT luego de la inyección intravenosa (i.v) e intraperitoneal (i.p) de 30 mg/kg de milnaciprán se muestra en el recuadro. Los datos se presentan con el tiempo como porcentaje de cambio de la línea de inicio. Todos los valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. $p < .05$ en comparación con el grupo tratado con solución salina.

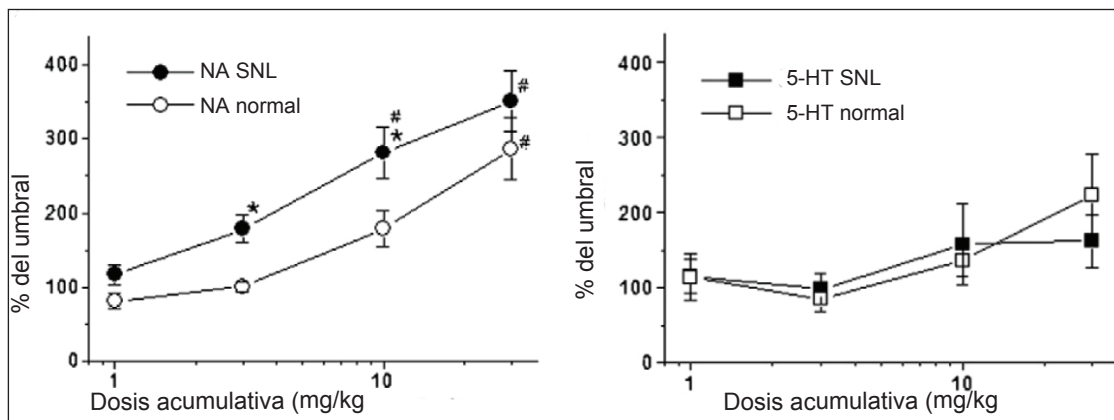


Figura 5. Estudios de microdiálisis para NA (A) y 5-HT (B) en el asta dorsal de la médula espinal lumbar en ratas normales y en ratas con ligadura de nervio espinal (LNE) luego de una inyección de milnaciprán de dosis acumulativa (1-30 mg/kg). El milnaciprán se administró por vía intravenosa a dosis de 1, 2, 7 o 20 mg/kg. El aumento en la NA después de la inyección de dosis acumulativa fue mayor en ratas con LNE que en las ratas normales ($p < 0,05$). Los datos se presentan con el tiempo como porcentaje de cambio de la línea de inicio. Todos los valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. $p < 0,05$ en comparación con las ratas normales; $p < 0,05$ en comparación con los valores de la línea de inicio.

luego de la inyección de dosis acumulativas de 1 a 30 mg/kg. El menor incremento en NA comparado con una única inyección de 30 mg/kg podría ser a partir del resultado de la eliminación de la droga entre las inyecciones (intervalos de 30 minutos). La concentración basal de NA antes de la inyección de la droga en ratas con LNE fue mayor que en las ratas normales ($0,029 \pm 0,005$ pg/IL en ratas con LNE y $0,012 \pm 0,001$ pg/IL en ratas normales, respectivamente; $p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía). Por lo tanto, el contenido total de NA en los dializados recogidos durante el estudio de dosis-respuesta acumulativo fue mayor en ratas con LNE ($9,28 \pm 0,97$ pg/60 IL) que en ratas normales ($6,48 \pm 0,63$ pg/60 IL, $p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía). En contraste, la concentración de 5-HT no aumentó luego de la inyección de dosis acumulativas de 1 a 30 mg/kg, y no hubo diferencia entre las ratas con LNE y los animales normales (Fig. 5B). La concentración basal de 5-HT antes de la inyección de la droga fue similar en las ratas con LNE y las ratas normales ($0,089 \pm 0,015$ pg/IL en ratas con LNE y $0,081 \pm 0,012$ pg/IL en ratas normales, respectivamente). El contenido total de 5-HT en los dializados recolectado durante el estudio fue similar en ratas con LNE ($5,33 \pm 1,05$ pg/60 IL) y en ratas normales ($5,59 \pm 0,79$ pg/60 IL). La figura 6 muestra la evolución en el tiempo de la variación en las concentraciones de NA y 5-HT en ratas con LNE luego de una inyección de paroxetina. Luego de una inyección intravenosa de paroxetina (10 mg/kg), se incrementó tanto la NA como la 5-HT en el asta dorsal de la médula espinal ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías). Las concentraciones de 5-HT fueron elevadas en 30 minutos y alcanzaron aproximadamente el 600% del valor de la línea de inicio a los 45 minutos, luego disminuyeron gradualmente. En contraste, las concentraciones de NA fueron elevadas a los 75 minutos y aumentaron lentamente a partir de entonces durante más de 5 horas luego de la inyección de la droga (esta información no se muestra). En el grupo tratado con vehículo, las concen-

traciones de NA y 5-HT en los dializados no han variado durante el transcurso del experimento. La figura 7 muestra la evolución en el tiempo del cambio en la concentración de NA y de 5-H en ratas con LNE luego de la inyección de maprotilina. Luego de una inyección intravenosa de maprotilina (10 mg/kg), la NA aumentó en 30 minutos y alcanzó aproximadamente el 350% al 400% de la línea de inicio ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías), y el incremento continuó por más de 6 horas luego de la inyección (la información no se muestra). La concentración de 5-HT no se incrementó en comparación con el grupo tratado con

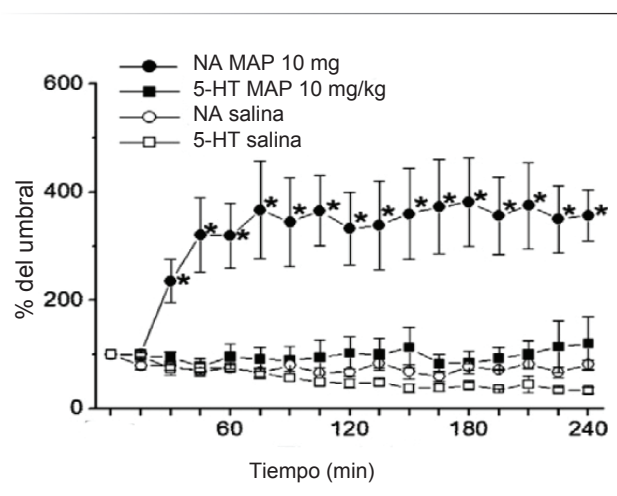


Figura 7. Estudios de microdiálisis para NA y 5-HT después de la inyección de maprotilina en el asta dorsal de la médula espinal lumbar. Ratas con LNE que recibieron solución salina intravenosa o maprotilina (MAP, 10 mg/kg). Tanto la NA como la 5-HT han aumentado luego de la inyección ($P < .05$ por ANOVA de 2 vías). Los datos se presentan con el tiempo como porcentaje de cambio de la línea de inicio. Todos los valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. ($p < .05$) en comparación con el grupo tratado con solución salina.

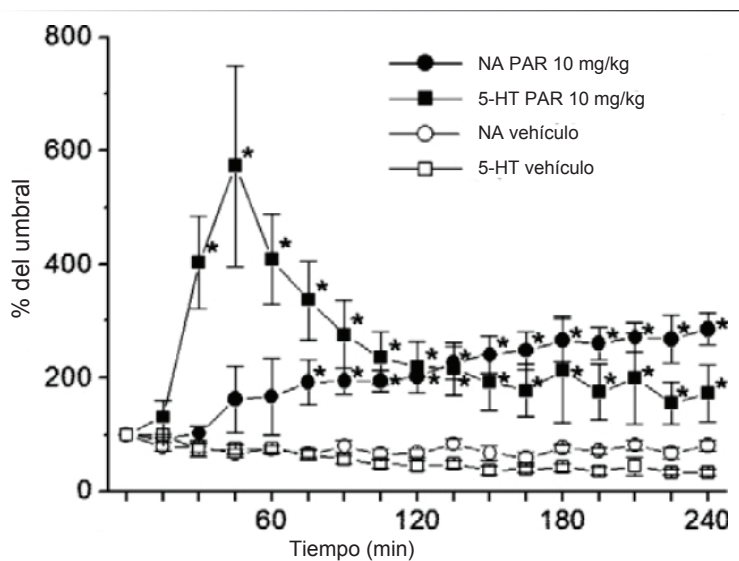


Figura 6. Estudios de microdiálisis para NA y 5-HT después de una inyección de paroxetina en el asta dorsal de la médula espinal lumbar. Ratas con LNE que han recibido solución salina intravenosa o paroxetina (PAR, 10 mg/kg). Tanto la NA como la 5-HT aumentaron luego de la inyección ($p < 0,05$ por ANOVA de 2 vías). Los datos se presentan con el tiempo como porcentaje de cambio de la línea de inicio. Todos los valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. ($p < 0,05$) en comparación con el grupo tratado con vehículo.

solución salina. En el grupo tratado con solución salina, las concentraciones de NA y de 5-HT en los dializados no han variado a lo largo del tiempo. La administración intravenosa de milnaciprán, paroxetina o maprotilina a las dosis usadas en los estudios de microdiálisis no produjeron efectos adversos, incluyendo depresión respiratoria, tras la inyección en animales despiertos o anestesiados.

Contenidos de NA y 5-HT en la médula espinal en controles y animales con dolor neuropático

También se determinaron los contenidos de NA y 5-HT en el tejido homogeneizado de la médula espinal de ratas normales y de ratas con LNE (Fig. 8). La concentración de NA fue mayor en el lado ipsilateral de la médula espinal en ratas con LNE ($320,3 \pm 13,0$ pg/mg, $n = 6$) comparado con ratas normales ($228,8 \pm 9,1$ pg/mg, $n = 6$, $p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía). La LNE también indujo un aumento en la concentración de 5-HT tanto en el lado ipsilateral ($732,5 \pm 25,0$ pg/mg, $n = 6$) como en el contralateral ($762,3 \pm 20,0$ pg/mg, $n = 6$) de la médula espinal, comparado con ratas normales ($565,4 \pm 30,0$ pg/mg, $n = 6$, $p < 0,05$ por ANOVA de 1 vía).

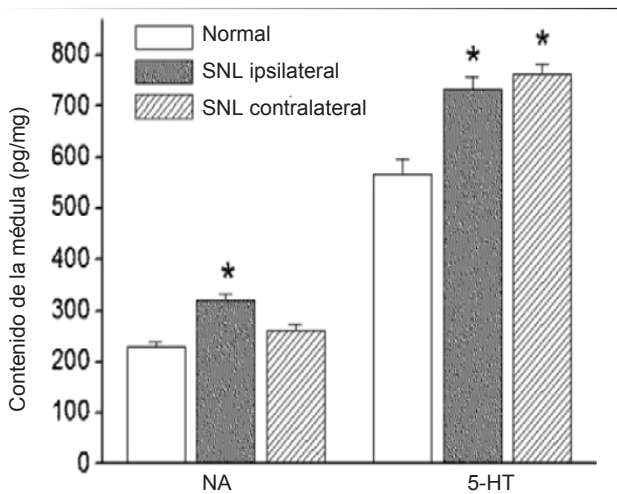


Figura 8. Los contenidos de NA y 5-HT (pg/mg de tejido húmedo) en la mitad lateral de la médula espinal lumbar fueron medidos en ratas normales y en ratas con LNE. En las ratas con LNE fueron medidas las mitades ipsilateral (ipsi) y contralateral (contra) de la médula espinal lumbar. Todos los valores representan la media \pm SEM para 6 ratas. $p < 0,05$ en comparación con las ratas normales.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, la inyección intraperitoneal de milnaciprán, paroxetina y maprotilina produjo efectos antihiperálgicos en ratas con LNE, dichos efectos fueron revertidos mediante la inyección espinal de un antagonista del adrenoceptor α_2 . Se ha incrementado tanto la NA como la 5-HT en la médula espinal luego de la inyección

sistémica de milnaciprán o paroxetina y sólo se incrementó la NA luego de la administración de maprotilina. Estos hallazgos sugieren que el aumento de NA en la médula espinal contribuye firmemente a los efectos antihiperálgicos de los antidepressivos, inclusive los ISRSs.

Efectos antihiperálgicos del milnaciprán

En el presente estudio, la inyección intraperitoneal de milnaciprán mostró un efecto antihiperálgico de tipo dosis-dependiente en ratas con LNE. En animales normales, sin embargo, el milnaciprán no produjo un efecto antinociceptivo. La desconexión entre el incremento de la NA espinal y la falta del efecto antinociceptivo en los animales normales, refleja el aumento relativamente bajo de NA espinal o las diferencias entre los estados normal y de dolor neuropático en la ubicación y función de los adrenoceptores α_2 en la médula espinal. En apoyo a esta última posibilidad, la inyección intratecal del antagonista del adrenoceptor α_2 , clonidina, que imita los efectos de la NA liberada a nivel espinal, ha incrementado la potencia y la eficacia en estados de dolor neuropático en animales²⁶ y en humanos²⁷. Varias causas potenciales para esta plasticidad luego de la lesión nerviosa han sido demostradas en animales, incluyendo la expresión aumentada del inhibidor de los adrenoceptores α_2 en el gen de la calcitonina, péptido relacionado que expresa aferentes²⁸, aumento de la eficiencia de la proteína G acoplada de los adrenoceptores α_2 espinales²⁹ y el aumento de la activación mediada por adrenoceptores α_2 de las interneuronas colinérgicas inhibitorias^{30,31}. En consonancia con el nivel de NA aumentado y el axón noradrenérgico brotando en el asta dorsal espinal luego de la LNE³², el presente estudio también ha demostrado que el milnaciprán indujo un aumento mayor en la NA espinal en ratas con LNE en comparación con ratas normales en base a la dosis-respuesta acumulativa obtenida con estudios de microdiálisis. Estos hallazgos sugieren que la lesión de nervio periférico potencia la eficacia y liberación de NA en la médula espinal y que el milnaciprán utiliza estos cambios plásticos para inducir una analgesia más poderosa mediante la NA después de la lesión del nervio que en la condición de control. Los estudios de microdiálisis han evidenciado un aumento de NA en más de 5 horas después de la inyección intraperitoneal de milnaciprán (30 mg/kg). El efecto antihiperálgico del milnaciprán sólo fue revertido por la inyección intratecal de un antagonista del adrenoceptor α_2 , idazoxan. Esto indica que el incremento de la NA en el asta dorsal espinal está implicado principalmente en el efecto antihiperálgico del milnaciprán en ratas con LNE. La inyección intratecal de idazoxan, sin embargo, no ha revertido completamente el efecto antihiperálgico del milnaciprán. Es posible que el aumento de 5-HT en la médula espinal haya jugado un rol en el efecto antihiperálgico del milnaciprán, aunque los antagonistas del receptor de 5-HT no han revertido el efecto

del milnaciprán. En el presente estudio, los antagonistas fueron inyectados 60 minutos después de la inyección de milnaciprán, cuando el efecto antihiperalgésico ya se había establecido y el nivel de 5-HT, disminuido. Por lo tanto, es probable que el aumento de 5-HT en la médula espinal contribuya, al menos en parte, a la fase de inducción del efecto antihiperalgésico del milnaciprán. Informes recientes han demostrado la implicación de los adrenoreceptores β_2 en los efectos antihiperalgésicos de varios antidepresivos en un modelo de dolor neuropático murino^{33,34}, lo cual puede proporcionar otro mecanismo posible para el efecto observado. Un estudio previo demostró que la administración intratecal de milnaciprán, pero no la administración intraperitoneal (30 mg/kg), inhibió la alodinia mecánica en ratas con LNE²². En el presente estudio, sin embargo, la inyección intraperitoneal de milnaciprán produjo un efecto antihiperalgésico dosis-dependiente. Se ha informado que la administración oral de 200 y 300 mg/kg de milnaciprán produce efectos antialodínicos en ratas con LNE²⁵. Por tanto, la discrepancia observada entre los dos estudios podría estar relacionada con la dosis.

Efectos antihiperalgésicos de paroxetina y maprotilina

En el presente estudio, la inyección intraperitoneal de paroxetina también redujo la hiperalgnesia mecánica, pero solamente a la dosis máxima (10 mg/kg).

Las vías serotoninérgicas descendentes han estado implicadas tanto en la modulación inhibitoria como en la facilitadora de la actividad neural espinal. Varios de los subtipos del receptor de 5-HT, incluyendo a los receptores 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2C y 5-HT3, contribuyeron a la acción antinociceptiva de la 5-HT en la médula espinal¹. Sin embargo, existe cierta controversia debido a que los efectos observados son altamente dependientes del modelo animal, al paradigma de las pruebas de comportamiento utilizado, así como también a las dosis de los agentes selectivos administrados.

Un estudio previo informó que los receptores 5-HT1A en la médula espinal están involucrados en el efecto antinociceptivo de la venlafaxina sistémica, un ISRS, en la fase tardía de la prueba de la formalina en ratas³⁵.

Otro estudio demostró que los receptores espinales 5-HT2A/2C contribuyeron al efecto antialodínico de la administración sistémica del ISRS fluvoxamina, en ratones con lesión de nervio periférico³⁶. En el presente estudio, el efecto antihiperalgésico de la paroxetina se revirtió por medio de la inyección intratecal del antagonista del receptor 5-HT3, ondansetrón. En contraste con esto, los antagonistas de los receptores 5-HT2A/2C, ketanserina y metisergida, los cuales tienen afinidad por los subtipos 5-HT1 y 5-HT2, no han revertido el efecto antihiperalgésico de la paroxetina. Este resultado se contrapone a los informes anteriores

acerca de que el dolor neuropático está asociado a una facilitación descendente aumentada mediada por la 5-HT actuando sobre los receptores espinales 5-HT3^{35,42}. Esta discrepancia podría ser explicada por los efectos duales de la activación del receptor 5-HT3 en el asta dorsal de la médula espinal. Varios estudios previos han demostrado que el efecto dominante de la activación del receptor 5-HT3 en la médula espinal es el nociceptivo, mediante la transmisión sináptica inhibitoria promovida por el GABA^{3,33,38}. Interesantemente, la administración intratecal del agonista selectivo del receptor 5-HT3, clorfenil biguanida, en ratas con LNE, invierte la alodinia mecánica establecida de modo GABA-dependiente³⁹, sugiriendo que la activación espinal del receptor 5-HT3 en un estado de dolor neuropático sigue poseyendo efectos inhibitorios. Aunque no está claro desde este estudio si semejante activación endógena espinal del receptor 5-HT3 ocurre luego de la inyección de paroxetina, nuestra información sugiere firmemente que un aumento de 5-HT en la médula espinal contribuye al efecto antihiperalgésico de la paroxetina. Estudios previos en ratas han demostrado que la antinocicepción espinal por 5-HT revirtió mediante la depleción de NA endógena^{40,41}. Otro informe sugiere que la NA es captada por un transportador de 5-HT y la 5-HT libera NA en respuesta a la actividad neuronal⁴². De acuerdo con estos informes, la NA en la médula espinal aumentó luego de la inyección de paroxetina en nuestros estudios de microdiálisis. El efecto antihiperalgésico de la paroxetina fue revertido también por la inyección intratecal de idazoxan. Estos resultados sugieren que el aumento de la NA en la médula espinal juega un rol importante en el efecto antihiperalgésico de la paroxetina. El papel importante del aumento de la NA en el efecto antihiperalgésico de los antidepresivos se ve apoyado por los resultados de la maprotilina. Hemos demostrado que la administración intraperitoneal de maprotilina (10 y 30 mg/kg) produjo un efecto antihiperalgésico que fue revertido solo por la inyección intratecal de idazoxan. El estudio de microdiálisis mostró que la maprotilina aumentó la NA, pero no la 5-HT, en la médula espinal. En el presente estudio, sin embargo, el efecto antihiperalgésico del milnaciprán fue más potente que el de la maprotilina. De acuerdo con estudios clínicos, nuestra información sugiere que la inhibición de la recaptación dual de NA y 5-HT, y no la inhibición selectiva de NA o 5-HT, y requiere que se refuercen los efectos inhibitorios de los antidepresivos para el dolor neuropático.^{11,41} En conjunto, nuestros resultados sugieren que la inhibición de la recaptación de NA es más importante que la de 5-HT en la inhibición del dolor neuropático, aunque un aumento en la 5-HT juega algún papel en el efecto de los antidepresivos.

Papeles de la NA y 5-HT en la médula espinal en el dolor neuropático

Existe alguna evidencia de que los pacientes con

dolor neuropático tienen una capacidad reducida para reclutar fisiológicamente vías inhibitorias descendentes⁴³. Varios tratamientos aprobados para el dolor neuropático en pacientes, incluidos los agonistas del adrenoceptor α_2 , clonidina²⁷ y gabapentina⁴⁴, así como los IRNS como se sugiere en el informe actual, interactúan con o imitan la activación de las vías noradrenérgicas bulboespinales para producir anestesia y potencialmente pueden superar o compensar la disminución de la función de la vía inhibitoria descendente. De acuerdo con un informe reciente³², el contenido de NA en la médula espinal se incrementó en las ratas con LNE en comparación con los animales normales. En conjunto con los resultados de los estudios de comportamiento y de microdiálisis, nuestros hallazgos sugieren firmemente que la activación de la vía inhibitoria noradrenérgica descendente y un aumento subsecuente de NA en el asta dorsal espinal, en el estado de dolor neuropático, contribuye a los efectos antihiperálgicos de los antidepressivos.

La densidad de las terminales serotoninérgicas y el contenido de 5-HT están regulados de forma dinámica luego de la lesión nerviosa. Tras una rizotomía dorsal, el brote de las terminales serotoninérgicas fue observado en regiones segmentarias de la médula espinal correspondientes a terminales deafferentadas^{45,46}. Luego de la lesión por constricción crónica del nervio ciático, los incrementos bilaterales en el contenido de 5-HT se observaron entre 7 y 14 días después de la cirugía⁴⁷. En un estudio reciente, los niveles espinales de 5-HT y su metabolito disminuyeron de forma transitoria en la médula espinal lumbar dorsal ipsilateral en ratas con LNE 7 días después de la cirugía, pero los niveles de inicio se recuperaron dentro de los 28 días⁴⁸. En este estudio, los niveles de 5-HT se incrementaron en la médula espinal bilateralmente en ratas con LNE. No está claro por qué tanto los aumentos como las disminuciones en el sistema serotoninérgico descendente fueron descritos luego de la lesión nerviosa; no obstante, puede deberse a diferencias en el grado o tipo de lesión nerviosa periférica. Serían necesarios más estudios para examinar el papel de la 5-HT en el asta dorsal espinal en diferentes tipos de lesiones nerviosas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado por una Subvención en Ayuda para la Investigación Científica (número de concesión 21791435, KN; 20591823, HO; 20791063, NI; 20791063) del Ministerio de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología, Tokio, Japón. Los autores agradecen al Dr. Devang Thakor, PhD, por el asesoramiento en la corrección del Inglés.

REFERENCIAS

1. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66:355–474.
2. Eide PK, Hole K. The role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes and plasticity in the 5-HT systems in the regulation of nociceptive sensitivity. *Cephalalgia* 1993;13:75–85.
3. Giordano J. Analgesic profile of centrally administered 2-methylserotonin against acute pain in rats. *Eur J Pharmacol* 1991;199:233–6.
4. Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* 2006;80:53–83.
5. Obata H, Saito S, Sasaki M, Ishizaki K, Goto F. Antiallo-dynic effect of intrathecally administered 5-HT₂ agonists in rats with nerve ligation. *Pain* 2001;90:173–9.
6. Yaksh TL, Pogrel JW, Lee YW, Chaplan SR. Reversal of nerve ligation-induced allodynia by spinal α_2 adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:207–14.
7. Rahman W, Suzuki R, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. *Pain* 2006;123:264–74.
8. Suzuki R, Rahman W, Hunt SP, Dickenson AH. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurons following peripheral nerve injury. *Brain Res* 2004;1019:68–76.
9. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 2007;132:237–51.
10. Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:137–51.
11. Dharmshaktu P, Tayal V, Kalra BS. Efficacy of antidepressants as analgesics: a review. *J Clin Pharmacol* 2012; 52:6–17.
12. Fürst S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 1999;48:129–41.
13. Micó JA, Ardid D, Berrocoso E, Eschaliér A. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:348–54.
14. Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:399–409.
15. Mochizuki D, Tsujita R, Yamada S, Kawasaki K, Otsuka Y, Hashimoto S, Hattori T, Kitamura Y, Miki N. Neurochemical and behavioural characterization of milnaciprán, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;162:323–32.
16. Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 2005;118:289–305.
17. Sindrup SH, Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 1999;83:389–400.
18. Koch S, Hemrick-Luecke SK, Thompson LK, Evans DC, Threlkeld PG, Nelson DL, Perry KW, Bymaster FP. Comparison of effects of dual transporter inhibitors on monoamine transporters and extracellular levels in rats. *Neuropharmacology* 2003;45:935–44.
19. Vaishnavi SN, Nemeroff CB, Plott SJ, Rao SG, Kranzler J, Owens MJ. Milnaciprán: a comparative analysis of human monoamine uptake and transporter binding affinity. *Biol Psychiatry* 2004;55:320–2.
20. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50:355–63.
21. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal suba-

- rachnoid space. *Physiol Behav* 1976;17:1031–6.
22. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111:409–19.
 23. Obata H, Saito S, Koizuka S, Nishikawa K, Goto F. The monoamine-mediated antiallodynic effects of intrathecally administered milnaciprán, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 2005;100:1406–10.
 24. Obata H, Kimura M, Nakajima K, Tobe M, Nishikawa K, Saito S. Monoamindependent, opioid-independent antihypersensitivity effects of intrathecally administered milnaciprán, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a postoperative pain model in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334:1059–65.
 25. Peters CM, Hayashida K, Ewan EE, Nakajima K, Obata H, Xu Q, Yaksh TL, Eisenach JC. Lack of analgesic efficacy of spinal ondansetron on thermal and mechanical hypersensitivity following spinal nerve ligation in the rat. *Brain Res* 2010;1352:83–93.
 26. Iyengar S, Webster AA, Hemrick-Luecke SK, Xu JY, Simmons RM. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor in persistent pain models in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:576–84.
 27. Paqueron X, Conklin D, Eisenach JC. Plasticity in action of intrathecal clonidine to mechanical but not thermal nociception after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 2003;99:199–204.
 28. The Epidural Clonidine Study Group, Eisenach JC, DuPen S, Dubois M, Miguel R, Allin D. Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain. *Pain* 1995;61:391–9.
 29. Eisenach JC, Zhang Y, Duflo F. Alpha2-adrenoceptors inhibit the intracellular Ca²⁺ response to electrical stimulation in normal and injured sensory neurons, with increased inhibition of calcitonin gene-related peptide expressing neurons after injury. *Neuroscience* 2005;131:189–97. [1] Alhaider AA, Lei SZ, Wilcox GL. Spinal 5-HT3 receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *J Neurosci* 1991; 11:1881–8.
 30. Bantel C, Eisenach JC, Duflo F, Tobin JR, Childers SR. Spinal nerve ligation increases alpha2-adrenergic receptor G-protein coupling in the spinal cord. *Brain Res* 2005;1038:76–82.
 31. Hayashida K, Eisenach JC. Spinal alpha 2-adrenoceptor-mediated analgesia in neuropathic pain reflects brain-derived nerve growth factor and changes in spinal cholinergic neuronal function. *Anesthesiology* 2010;113:406–12.
 32. Obata H, Li X, Eisenach JC. Alpha2-Adrenoceptor activation by clonidine enhances stimulation-evoked acetylcholine release from spinal cord tissue after nerve ligation in rats. *Anesthesiology* 2005;102:657–62.
 33. Hayashida K, Clayton BA, Johnson JE, Eisenach JC. Brain derived nerve growth factor induces spinal noradrenergic fiber sprouting and enhances clonidine analgesia following nerve injury in rats. *Pain* 2008;136:348–55.
 34. Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Tessier LH, Muller A, Hein L, Freund- Mercier MJ, Barrot M. Beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann Neurol* 2009;65:218–25.
 35. Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demoulière N, Doridot S, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M. Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol Dis* 2009;33:386–94.
 36. Bonnefont J, Chapuy E, Clottes E, Alloui A, Eschalièr A. Spinal 5-HT1A 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;114:482–90.
 37. Honda M, Uchida K, Tanabe M, Ono H. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, exerts its antiallodynic effects on neuropathic pain in mice via 5-HT2A/2C receptors. *Neuropharmacology* 2006;51:866–72.
 38. Alhaider AA, Lei SZ, Wilcox GL. Spinal 5-HT3 receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *J Neurosci* 1991;11:1881–8.
 39. Kawamata T, Omote K, Toriyabe M, Yamamoto H, Namiki A. The activation of 5-HT(3) receptors evokes GABA release in the spinal cord. *Brain Res* 2003;978:250–5.
 40. Okazaki R, Namba H, Yoshida H, Okai H, Miura T, Kawamura M. The antiallodynic effect of Neurotrophin is mediated via activation of descending pain inhibitory systems in rats with spinal nerve ligation. *Anesth Analg* 2008;107:1064–9.
 41. Archer T, Jonsson G, Minor BG, Post C. Noradrenergic-serotonergic interactions and nociception in the rat. *Eur J Pharmacol* 1986;120:295–307.
 42. Sawynok J, Reid A. Interactions of descending serotonergic systems with other neurotransmitters in the modulation of nociception. *Behav Brain Res* 1996;73:63–8.
 43. Vizi ES, Zsilla G, Caron MG, Kiss JP. Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. *J Neurosci* 2004;24:7888–94.
 44. Witting N, Svensson P, Jensen TS. Differential recruitment of endogenous pain inhibitory systems in neuropathic pain patients. *Pain* 2003;103:75–81.
 44. Hayashida K, Obata H, Nakajima K, Eisenach JC. Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology* 2008;109:1077–84.
 46. Polistina DC, Murray M, Goldberger ME. Plasticity of dorsal root and descending serotonergic projections after partial deafferentation of the adult rat spinal cord. *Comp Neurol* 1990;299:349–63.
 47. Ramer LM, McPhail LT, Borisoff JF, Soril LJ, Kaan TK, Lee JH, Saunders JW, Hwi LP, Ramer MS. Endogenous TrkB ligands suppress functional mechanosensory plasticity in the deafferented spinal cord. *J Neurosci* 2007;27:5812–22.
 48. Satoh O, Omote K. Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral mononeuropathy. *Brain Res* 1996;728:27–36.
 49. Liu FY, Qu XX, Ding X, Cai J, Jiang H, Wan Y, Han JS, Xing GG. Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. *Brain Res* 2010;1330:45–60.