

## **Interacción entre gabapentina y D-serina en la prueba orofacial de la formalina.**

*Belkis Quiñónez<sup>1,2</sup>, Elizabeth Silva<sup>1</sup>, Luis E. González<sup>1</sup> y Luis Hernández<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología de la Conducta, Departamento de Fisiología y

<sup>2</sup>Departamento de Farmacología. Escuela de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

**Palabras clave:** Prueba orofacial de la formalina, gabapentina, D-serina, acicalado facial, dolor trigeminal.

**Resumen.** La gabapentina es un agente útil para el alivio de la neuralgia del trigémino y el dolor orofacial fantasma. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto antinociceptivo de la gabapentina en los modelos de dolor orofacial. En este trabajo se investigó el efecto antinociceptivo de la gabapentina sobre el acicalado facial en la rata, provocado por la inyección de la formalina, un paradigma de dolor orofacial. La dosis de 10 mg/kg IP de la gabapentina produjo una drástica disminución del acicalado facial en la fase I y II indicando un claro efecto antinociceptivo. Sin embargo, en la dosis de 1 mg/kg IP, la gabapentina tuvo un efecto antinociceptivo sólo en la fase I. La D-serina (100 µg, ICV) no produjo efecto inyectada sola y no antagonizó el efecto antinociceptivo de la gabapentina. Por el contrario, la combinación de la gabapentina-1 mg/kg IP más D-serina redujo significativamente el acicalado facial en la fase II. Este resultado muestra una diferencia con estudios en que la gabapentina induce antinocicepción en la prueba de la formalina en la pata de la rata sólo en la fase II y la D-serina antagoniza a la gabapentina. Los resultados se discuten en relación al proceso de dolor en la pata posterior versus la estimulación dolorosa orofacial.

## **Interaction between gabapentin and D-serin in the formalin orofacial test.**

*Invest Clin 2009; 50(4): 479 - 489*

**Key words:** Orofacial formalin test, gabapentin, D-serine, face grooming, trigeminal pain

**Abstract.** Gabapentin is a useful agent for the relief of trigeminal neuralgia and orofacial phantom pain. However, there is scarce information on the gabapentin analgesic effect in orofacial pain models. We tested the analgesic action of gabapentin on the formalin-induced face grooming in the rat, an orofacial pain paradigm. IP Gabapentin (10 mg/kg), induced a drastic reduction in face grooming during phase I and II, indicating a clear-cut antinociceptive effect. However, at 1 mg/kg, gabapentin had an analgesic effect only on phase I. D-serine (100  $\mu$ g, ICV) was silent when given alone and did not antagonize the antinociceptive effect of gabapentin. On the contrary, gabapentin 1 mg/kg plus D-serine significantly reduced face grooming in phase II. These results show a difference between gabapentin induced orofacial analgesia and previous studies showing gabapentin-induced hind paw analgesia in the formalin test, only during phase II, as well as D-serine antagonism of gabapentin. The results are discussed in terms of different pain processing of hind paw, versus orofacial nociceptive stimulation.

*Recibido: 06-10-2008. Aceptado: 30-04-2009.*

### **INTRODUCCIÓN**

La gabapentina, un análogo estructural del ácido gamma amino butírico (GABA), alivia el dolor asociado a la neuropatía diabética (1), a la neuralgia post herpética (2), a la neuralgia trigeminal (3,4) y al dolor orofacial fantasma (5). Varios estudios experimentales apoyan estas observaciones clínicas. La gabapentina reduce la hiperalgesia térmica y mecánica, tanto como la alodinia en los modelos de dolor neuropático producido por inyecciones de anticuerpos (6), ligadura del nervio ciático, ligadura de nervios de la médula espinal (7-9) o inoculación de virus herpes (10) en ratones. La gabapentina bloquea la respuesta dolorosa inducida por la carragenina y la inyección de formalina en la pata trasera de la rata sugiriendo un alivio del dolor infla-

matorio (11-18). La D-serina está considerada como un ligando endógeno de los receptores NMDA en el cerebro a través del sitio de acción de la glicina. La D-serina tiene un rol fisiológico en la plasticidad sináptica y fisiopatológico importante en la excitotoxicidad y la neuroinflamación que induce la muerte neuronal, como en el dolor neuropático (19). El patrón de las variaciones regionales y cambios postnatales en la D-serina cerebral está estrechamente relacionado con la subunidad R2 de los receptores excitadores NMDA. La D-serina puede tener un rol modulador positivo en los receptores NMDA que contienen la subunidad R2 y realiza un papel importante controlando la expresión conductual en los mamíferos (20).

Se ha sugerido que la gabapentina produce analgesia aumentando la transmisión

gabaérgica (21) y bloqueando los canales de calcio voltaje dependientes (22-27).

La D-serina antagoniza la acción analgésica de la gabapentina. Este efecto se atribuye a la unión de la D-serina con el sitio de receptor de la glicina del NMDA (28,15). El antagonismo competitivo de la D-serina ha sido cuestionado (15, 29, 30). Existen evidencias neuroquímicas que sugieren que la gabapentina modula la activación del receptor NMDA al aumentar la afinidad de la glicina por el receptor NMDA en presencia de la proteinkinasa C (PKC). La PKC está elevada en los tejidos inflamados y la gabapentina pudiera actuar selectivamente sobre las células afectadas por la inflamación (31). Recientes estudios confirman que la gabapentina actúa a nivel de los receptores NMDA porque ejerce un efecto protector contra el daño neuronal inducido por el glutamato, al menos en parte, al inhibir las corrientes iónicas activadas por el receptor NMDA (32). Además la gabapentina ejerce el efecto antinociceptivo al inhibir de manera no competitiva el receptor glutamatergico NMDA (33).

La prueba de la formalina fue satisfactoriamente adaptada por Clavelou y col. (34) para el estudio del dolor orofacial en la rata.

Estos experimentos se realizaron para investigar el efecto de la gabapentina sobre la conducta dolorosa provocada por la inyección de formalina en la región orofacial y para averiguar si la D-serina puede o no revertir este efecto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Ochenta ratas machos Wistar de peso 250-350 g se colocaron en jaulas individuales con agua y comida *ad libitum* al menos 5 días antes de los experimentos. Cada animal se usó una sola vez y fue sacrificado al final de la sesión experimental con una sobredosis de cloroformo.

### Fármacos

La formalina se preparó al 5% en solución salina de una solución de formaldehído al 37% (Laboratory Chemicals-Cer Diagnostic, Caracas, Venezuela). La gabapentina (Warner Lambert, MO, USA) fue disuelta en solución salina. La D-serina (Sigma, Saint Louis, MO, USA) se disolvió en líquido céfalo raquídeo artificial (LCRa), preparado fresco diariamente en el laboratorio (NaCl 135 mM, KCl 3,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM y NaHCO<sub>3</sub> 10mM a un pH 7,4).

### Cirugía

La cirugía estereotáxica se realizó bajo anestesia con ketamina intraperitoneal (IP) (50 mg/kg) y pentobarbital IP (20 mg/kg) para implantar una cánula de 21 ga-10 mm longitud en los ventrículos cerebrales. La microinyección se realizó con una aguja de 12 mm de longitud (protruyendo 2 mm de la cánula guía), con las siguientes coordenadas: 8 mm posterior al bregma, 1,4 mm lateral a la sutura sagital y 3,0 mm ventral a la superficie del cráneo (35). Después de la cirugía se esperó una semana para la recuperación de los animales.

### La prueba orofacial de la formalina y la administración de fármacos

Diez minutos antes de cada ensayo se permitió a las ratas explorar la caja de plexiglas (37 × 30 × 30 cm); esta habituación y la prueba se hicieron en un ambiente a prueba de sonidos, con una luz artificial de 50 lux provenientes de una lámpara colocada a un metro por encima del área de observación.

La prueba orofacial de la formalina se hizo en animales conscientes, de acuerdo a Clavelou y col. (34). Un investigador sostuvo gentil, pero firmemente a la rata y el otro le inyectó 50 µL de formalina subcutánea al 5% usando una aguja 27-gauge, en la parte derecha del labio superior lo más cerca posible de la nariz. La rata se dejó en la

caja de plexiglas inmediatamente después de la inyección. Una cámara fue colocada a 80 cm de las paredes transparentes de la caja, y un espejo se puso en la pared opuesta permitiendo una vista completa del animal. La conducta del animal se observó desde una habitación adyacente por un circuito cerrado de TV. Una PC provista de un programa de software con un contador de tiempo y un contador de actividad, permitieron contabilizar la frecuencia y duración del acicalado facial. Cada ensayo duró 60 min en total y el tiempo de acicalado (en seg) fue registrado durante 12 períodos consecutivos de 5 min cada uno. El acicalado facial se definió como el frotamiento del área perioral con cualquier pata. El observador fue ciego para el tratamiento con los fármacos. Las sesiones experimentales se realizaron entre las 7am y 6 pm.

### Diseño experimental

La gabapentina (1 y 10 mg/kg) se administró IP 30 min antes de la inyección de formalina o solución salina. La D-serina (100  $\mu$ g) o LCRA se inyectaron en el cerebro intraventricularmente (5  $\mu$ L a 1  $\mu$ L/min) inmediatamente antes del gabapentin (1 y 10 mg/kg, IP) o solución salina IP.

El efecto de la inyección de formalina en el acicalado facial y efecto de la inyección de solución salina en el acicalado facial.- Los animales fueron inyectados con formalina (n=10) o salina (n=10) en su labio superior derecho.

### Interacción entre gabapentina y D-serina

Sesenta animales recibieron una inyección de formalina en el labio superior. Un grupo (n=10), recibió una inyección de salina IP y una inyección intra cerebro ventricular (ICV) de líquido céfalo raquídeo artificial (LCRA); otro salina IP y D-serina 100  $\mu$ g ICV (n=10); otro grupo recibió gabapentina 1 mg/kg IP y LCRA ICV (n=10), otro gabapentina 10 mg/kg IP y LCRA ICV

(n=10); otro gabapentina 1 mg/kg IP y D-serina 100  $\mu$ g ICV (n = 10), y otro gabapentina 10 mg/kg IP y D-serina 100  $\mu$ g ICV (n=10).

Los presentes experimentos se ciñeron estrictamente a la Guía para la investigación en dolor en animales conscientes (36) y fueron aprobados por los comités de ética locales.

### Análisis de datos y estadística

Las fases de la prueba se definieron de la siguiente forma. Fase I: Los 5 minutos siguientes a la inyección de formalina (los minutos que van del 6 al 10 no se consideraron porque en este período el animal no registró conducta de dolor lo que correspondería a la llamada interfase o período de analgesia endógena). Fase II: correspondió a la sumatoria de la duración del acicalado facial desde los 11 a los 60 minutos después de la inyección de formalina.

El tiempo de acicalado facial se expresó como promedio del número de segundos por cada 5 minutos (media  $\pm$  SEM). El efecto de la inyección de la formalina y la solución salina sobre esta conducta se analizó con la prueba ANOVA para medidas repetidas. El efecto de la gabapentina, la D-serina y sus combinaciones, fue analizado para cada una de las fases de la prueba mediante el ANOVA de una vía seguido por la prueba *Tukey's post-hoc*.

El nivel de significancia se fijó a  $p < 0,05$  y el programa estadístico usado fue SPSS 8.0 para Windows.

## RESULTADOS

### El efecto de la inyección de formalina en el acicalado facial y efecto de la inyección de salina en el acicalado facial

La inyección de formalina subcutánea en el labio superior produjo una respuesta dolorosa bifásica como ha sido descrita previamente en la prueba de la formalina. El

acicalado facial aumentó durante los primeros 5 min disminuyendo entre el min 6 y 10, y alcanzando un segundo incremento entre el min 11 y 60, después de la inyección de formalina. De acuerdo con la prueba de la formalina, estos cambios en el tiempo corresponden a la fase I: 0-5 min (más la interfase: 6-10 minutos), y fase II (11-60 min), respectivamente. En contraste los animales que recibieron una inyección de solución salina en el labio superior presentaron muy bajos niveles de acicalado facial cuando se compara con el grupo que recibió formalina en el labio superior (Fig. 1).

#### Interacción entre la gabapentina y la D-serina

**Fase I.** Ambas dosis de la gabapentina IP (1 y 10 mg/kg) disminuyeron el acicalado facial. La D-serina sola no tuvo efecto sobre el acicalado facial. Las combinaciones de D-serina con cualquier dosis de la gabapentina disminuyeron significativamente el acicalado facial ( $F(5,60) = 4,3$ ;  $p < 0,002$ ) (Fig. 2A).

**Fase II.** La gabapentina en dosis de 10 mg/kg IP disminuyó el acicalado facial. Este efecto no fue observado con la dosis de 1 mg/kg IP. La D-serina sola no tuvo efecto, pero la combinación de D-serina con cualquier dosis de gabapentina IP (1 y 10 mg/kg) disminuyó el acicalado facial. ( $F(5,60) = 4,1$ ;  $p < 0,003$ ) (Fig. 2B).

#### DISCUSIÓN

El patrón de respuesta dolorosa a la inyección de formalina en la región orofacial observado en estos experimentos es similar al reportado por otros autores (34-37). Los animales inyectados con formalina despliegan una típica respuesta bifásica de acicalado facial. La fase I y la fase II de la prueba de la formalina se piensa que representan diferentes procesos nociceptivos. La fase II, responde a los fármacos anti inflamatorios y se acompaña de los signos de la inflamación (37-39). La respuesta dolorosa del acicalado facial fue suprimida por la gabapentina, tal y como se observó previamente en modelos experimentales y estudios clínicos.

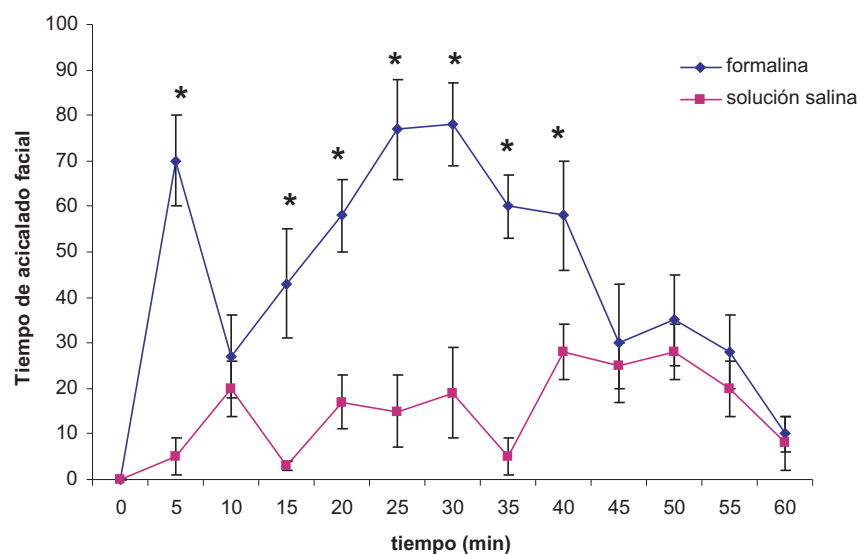


Fig. 1. Tiempo de acicalado facial promedio ( $\pm$  SEM) medido durante períodos de 5 min en ratas, inmediatamente después de la inyección subcutánea de formalina cerca del labio superior, comparado con la inyección de solución salina en el mismo lugar (\* $p < 0,05$ ). Estas mediciones se hicieron en la fase I y en la fase II.

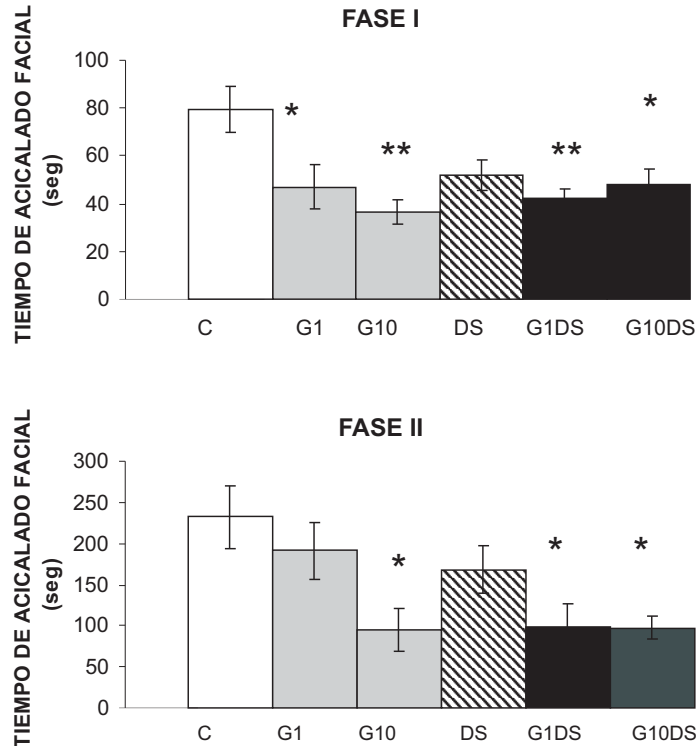


Fig. 2. Tiempo de acicalado facial promedio ( $\pm$  SEM) medido durante 60 min. en ratas, inmediatamente después de la inyección subcutánea de formalina cerca del labio superior en la **Fase I** (Fig 2A) y la **Fase II** (Fig 2B). C: Control inyección de formalina cerca del labio superior y 30 min antes inyección IP de salina. La **gabapentina** 1 y 10 mg/kg (G1 y G10, respectivamente) se les inyectó IP, treinta min. antes de la inyección de formalina. La D-serina 100  $\mu$ g (DS) o el **LCRa** fueron inyectados ICV, inmediatamente antes de la gabapentina 1 mg (G1DS) y 10 mg (G10DS), IP o salina IP. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  comparado con el control).

Estudios experimentales del efecto de la gabapentina administrada conjuntamente con la D-serina sobre el dolor orofacial inducido por formalina no han sido reportados. La gabapentina también es efectiva para reducir la conducta dolorosa por la inyección de formalina en la pata trasera de la rata. Diferiendo de nuestros resultados, varios autores han encontrado que la gabapentina tiene un efecto antinociceptivo solo en la fase II de la inyección de formalina en la pata trasera de la rata (11, 12, 15, 17, 18, 40-42).

Esto sugiere que el dolor orofacial y el dolor de la pata trasera pudieran ser modulados por mecanismos distintos ya que el sistema trigeminal del dolor difiere anatómica y funcionalmente del sistema de dolor de la médula espinal. El asta dorsal medular

presenta una organización laminar mientras que el complejo trigeminal posee una organización vertical ascendente que permite el estudio de los mecanismos segmentales de procesamiento del dolor (43).

En contraste con las proyecciones bidireccionales de las fibras espinales a nivel de la médula espinal, las fibras del complejo trigeminal del tallo cerebral forman principalmente un sistema ascendente que une el subnúcleo caudal (principal relevo de la información de dolor orofacial) con las porciones más rostrales del núcleo espinal trigeminal (44).

Existe una diversidad molecular de los receptores NMDA que muestran heterogeneidad en sus propiedades farmacológicas dependiendo de la región cerebral (45) y di-

ferencias en las subunidades de los receptores NMDA entre el cordón espinal cervical y el cordón lumbar en roedores (46, 47). La D-serina es un modulador del NMDA que contiene la subunidad R2B, sin embargo en la transmisión del dolor orofacial se ha implicado el receptor NMDA que contiene la subunidad NR1 (48, 49).

En comparación con el asta dorsal espinal, el subnúcleo caudal presenta mayor densidad de fibras que contienen isolectina B4, (IB4), un marcador de las neuronas dependientes del factor neurotrófico glial, y menor densidad de fibras que expresan sustancia P y el péptido relacionado al gen de calcitonina (CGPR) (43). Hay experimentos que indican que algunos fármacos se comportan de manera diferente en la médula espinal y en los núcleos del trigémino, por ejemplo el donador de óxido nítrico (NO), Nitroglicerina (NTO) produce mayor hiperalgesia actuando en neuronas de segundo orden en el núcleo caudal del trigémino, que en el cuerno dorsal de la médula espinal lumbar (50-52). Aparentemente no existe una buena correlación entre las respuestas nociceptivas conductuales a la inyección de formalina en la pata y la respuesta conductual a la inyección de formalina en el labio (53) lo cual sugiere que algunas fármacos podrían afectar de manera diferente estas conductas en los animales (54, 55).

Trabajos previos han mostrado que la administración de D-serina en los ventrículos cerebrales revierte el efecto analgésico, ansiolítico y anticonvulsivante de la gabapentina (15). En nuestro trabajo, la D-serina sola no tuvo efecto sobre el acicalado facial y no revirtió el efecto antinociceptivo de la gabapentina (1 mg/kg y 10 mg/kg) durante la fase I y la fase II. Pero sorprendentemente, la co-administración de D-serina ICV y gabapentina IP (1 mg/kg) disminuyó el acicalado facial en la fase II ( $p < 0,02$ ), mientras que ni la gabapentina (1mg/kg) ni la D-serina tuvieron efecto

cuando se administraron por separado. Este resultado sugiere un efecto aditivo de la D-serina y la gabapentina a bajas dosis en la fase II, posiblemente en algunas de las subunidades de los receptores NMDA.

Las discrepancias con experimentos previos donde la D-serina actúa como un antagonista de la gabapentina no pueden ser explicadas por el rango de las dosis o la vía de administración. Pero quizás lo más importante aquí es el lugar en que se aplica, esto es la prueba de formalina en la pata de la rata (15) y en nuestro caso la prueba de formalina orofacial. Es posible que las diferencias 1) anatómicas de las vías, de la diversidad de subunidades de los receptores NMDA en su distribución cerebral y su función, 2) de la activación de neurotransmisores y péptidos, 3) de las respuestas conductuales y 4) de la respuesta ante diversos fármacos, descritas en párrafos anteriores, sean importantes en el estudio de esta interacción. Por ejemplo, la inyección de NMDA ICV produce antinocicepción en la prueba orofacial de la formalina en ratas en libre movimiento, sugiriendo que la activación de los NMDA en este modelo de dolor produce un efecto antinociceptivo distinto a lo que ocurre en la prueba de la formalina en la pata en que la activación de los NMDA produce dolor (56).

En los últimos años, estudios de varios grupos de investigación han demostrado que la D-serina es fisiológicamente un co-agonista de los receptores excitadores glutamatérgicos NMDA (57, 58).

Está bien establecido que la D-serina, un co-agonista de los receptores de glutamato NMDA del tipo NR1 y NR2, tiene altas concentraciones en el cerebro de mamíferos y muestra una ubicación selectiva relacionada con la subunidad R2B y existe tanto en las neuronas como en la glía (59).

Aunque los estudios de radioligandos no han mostrado que la gabapentina inhiba al sitio de la glicina en las membranas cere-

brales o inflencie la unión del MK-801 al canal receptor NMDA (60), experimentos que usan la técnica del parche (*whole-cell patch*) han encontrado que la gabapentina compromete las corrientes evocadas del receptor NMDA en las neuronas del cuerno dorsal de la médula espinal en presencia de inflamación o de la PKC, lo que resulta en un aumento de la afinidad del sitio la glicina en los receptores NMDA (31).

Los resultados de nuestro estudio indican que la gabapentina IP (10 mg/kg IP) fue altamente efectiva en ambas fases del dolor orofacial inducido por un estímulo doloroso de origen químico. También mostró la eficacia antinociceptiva de la gabapentina IP en bajas dosis (1 mg/kg) combinada con D-serina ya que disminuyó el acalado facial en la fase II.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al proyecto ULA-CDCHT M- M-823-05-03-B, del Consejo de Desarrollo Científico, Tecnológico y Humanístico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes (ULA).

#### REFERENCIAS

1. **Morello CM, Leckband SG, Stoner PO, Moorhous DF, Sahagian GA.** Randomized double-blind study comparing the efficacy of gabapentin with amitriptyline on diabetic peripheral neuropathy pain. *Arch Intern Med* 1999; 159:1931-1937.
2. **Kanazi GE, Johnson RW, Dworkin RH.** Treatment of postherpetic neuralgia. *Drugs* 2000; 59:1113-1126.
3. **Guerrero-Figueroa R, Escobar-Juyo A, Caballero-García G, Blanco-Castillo IP.** The effect of gabapentin in bucco-facial allodynia. Experimental correlation of the trigeminal nerve. *Rev Neurol* 1999; 29: 1147-1153.
4. **Khan OA.** Gabapentin relieves trigeminal neuralgia in multiple sclerosis patients. *Neurology* 1998; 51:611-614.
5. **Marbach JJ.** Medically unexplained chronic orofacial pain. Temporomandibular pain and dysfunction syndrome, orofacial phantom pain, burning mouth syndrome, and trigeminal neuralgia. *Med Clin North Am* 1999; 83:691-710.
6. **Gillin S, Sorkin LS.** Gabapentin reverses the allodynia produced by the administration of anti-GD2 ganglioside, an immunotherapeutic drug. *Anesth Analg* 1998; 86:111-116.
7. **Cheng JK, Pan HL, Eisenach JC.** Anti-allodynic effect of intrathecal gabapentin and its interaction with clonidine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 2000; 92:1126-1131.
8. **Hao JX, Xu XJ, Urban L, Wiesenfeld-Hallin Z.** Repeated administration of systemic gabapentin alleviates allodynia-like behaviors in spinally injured rats. *Neurosci Lett* 2000; 280:211-214.
9. **Kayser V, Christensen D.** Antinociceptive effect of systemic gabapentin in mono-neuropathic rats, depends on stimulus characteristics and level of test integration. *Pain* 2000; 88:53-60.
10. **Takasaki I, Andoh T, Nojima H, Shiraki K, Kuraishi Y.** Gabapentin antinociception in mice with acute herpetic pain induced by herpes simplex virus infection. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296:270-275.
11. **Field MJ, Oles RJ, Lewis AS, McCleary S, Hughes J, Singh L.** Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *Br J Pharmacol* 1997; 121:1513-1522.
12. **Kaneko M, Mestre C, Sánchez EH, Hammond DL.** Intrathecally administered gabapentin inhibits formalin-evoked nociception and the expression of fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292:743-751.
13. **Lu Y, Westlund KN.** Gabapentin attenuates nociceptive behaviors in a acute arthritis model in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290:214-219.
14. **Shimoyama N, Shimoyama M, Davis AM, Inturrisi CE, Elliott KJ.** Spinal gabapentin is antinociceptive in the rat formalin test. *Neurosci Lett* 1997; 222:65-67.



15. **Singh L, Field MJ, Ferris P, Hunter JC, Oles RJ, Williams RG, Woodruff GN.** The antiepileptic agent gabapentin (Neurontin) possesses anxiolytic -like and antinociceptive actions that are reversed by D-serine. *Psychopharmacology* 1996; 127: 1-9.
16. **Stanfa LC, Singh L, Williams RG, Dickenson AH.** Gabapentin, ineffective in normal rats, markedly reduces C-fiber evoked responses after inflammation. *NeuroReport* 1997; 8:587-590.
17. **Yoon MH, Yaksh TL.** Evaluation of interaction between gabapentin and ibuprofen on the formalin test in rats. *Anesthesiology* 1996; 91:1006-1013.
18. **Yoon MH, Yaksh TL.** The effect of intrathecal gabapentin on pain behavior and hemodynamics on the formalin test in the rat. *Anesth Analg* 1996; 89:434-439.
19. **Ying-Luan Z, Zhao YL, Mori H.** Role of D-serine in the mammalian brain. *Brain Nerve* 2007; 59:725-730.
20. **Nishikawa T.** Metabolism and functional roles of endogenous D-serine in mammalian brains. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1561-1565.
21. **Block F.** Gabapentin therapy for pain. *Nervenarzt* 2001; 72:69-77.
22. **Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D.** Identification of the  $\alpha_2\delta$ -1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:17537-17542.
23. **Ortiz MI, Medina-Tato DA, Sarmiento-Heredia D, Palma-Martinez J, Granados-Soto V.** Possible activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-K<sup>+</sup> channels pathway by gabapentin on the formalin test. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 83: 420-427.
24. **Horga de la Parte JF, Horga A.** Pregabalin: new therapeutic contributions of calcium channel  $\alpha_2\delta$  protein ligands on epilepsy and neuropathic pain. *Rev Neurol* 2006; 42:223-237.
25. **Alden KJ, García J.** Differential effect of gabapentin on neuronal and muscle calcium currents. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297:727- 735.
26. **Gee NS, Brown JP, Dissanayake VUK, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN.** The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the  $\alpha_2\delta$  subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 1996; 271: 5768-5776.
27. **Dooley DJ, Mieske CA, Borosky SA.** Inhibition of K<sup>+</sup>-evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neurosci Lett* 2000; 280:107-110.
28. **Mao J, Chen LL.** Gabapentin in pain management. *Anesth Analg* 2000; 91: 680-687.
29. **Shimoyama M, Shimoyama N, Hori Y.** Gabapentin affects glutamatergic excitatory neurotransmission in the rat dorsal horn. *Pain* 2000; 85:405-414.
30. **Cheng JK, Chiou LC.** Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin. *J Pharmacol Sci* 2006; 100:471-486.
31. **Gu Y, Huang LM.** Gabapentin actions on N-methyl-D-aspartate receptor channels are protein kinase C-dependent. *Pain* 2001; 93:85-92.
32. **Kim YS, Chang HK, Lee JW, Sung YH, Kim SE, Shin MS, Yi JW, Park JH, Kim H, Kim CJ.** Protective effect of gabapentin on N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in rat hippocampal CA1 neurons. *J Pharmacol Sci* 2009; 109:144-147.
33. **Hara K, Sata T.** Inhibitory effect of gabapentin on N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007; 51:122-128.
34. **Clavelou P, Pajot J, Dallel R, Raboisson P.** Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neurosci Lett* 1989; 103:349-353.
35. **Paxinos G, Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates (2nd ed.). San Diego, CA: Academic Press. 1986
36. **Zimmermann M.** Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16:109-110.
37. **Eisenberg E, Vos BP, Strassman AM.** The peripheral antinociceptive effect of mor-

- phine in a rat model of facial pain. *Neuroscience* 1996; 72:519-525.
38. **Hunskar S, Hole K.** The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30: 103-114.
  39. **Tjolsen A, Berge OG, Hunskar S, Rosland JH, Hole K.** The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
  40. **Munro G.** Pharmacological assessment of the rat formalin test using the clinically used analgesic drugs gabapentin, lamotrigine, morphine, duloxetine, tramadol and ibuprofen: Influence of low and high formalin concentrations. *Eur J Pharmacol* 2009; 605(1-3):95-102.
  41. **Carlton SM, Zhou S.** Attenuation of formalin-induced nociceptive behaviors following local peripheral injection of gabapentin. *Pain* 1998; 76:201-207.
  42. **Ceseña RM, Calcutt NA.** Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. *Neurosci Lett* 1999; 262: 101-104.
  43. **Dallel R, Villanueva L, Woda A, Voisin D.** Neurobiology of trigeminal pain. *Med Sci (Paris)* 2003; 19:567-574.
  44. **Bereiter DA, Hirata H, Hu JW.** Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. *Pain* 2000; 88:221-224.
  45. **Yamakura T, Shimoji K.** Subunit – and site– specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 1999; 59:279-298.
  46. **Tölle TR, Berthele A, Zieglgansberger W, Seeburg PH, Wisden W.** The differential expression of NMDA and non NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductual gray. *J Neurosci* 1993; 13:5009-5028.
  47. **Watanabe M, Mishima M, Inoue Y.** Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNA in the brainstem. *J Comp Neurol* 1994; 343:520-531.
  48. **Dohrn CS, Beitz AJ.** NMDA receptor mRNA expression in NOS-containing neurons in the spinal trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 1994a; 175:28-32.
  49. **Dohrn CS, Beitz AJ.** Differential NMDA NR1 mRNA expression among spinal trigeminal neurons that project to different targets. *Neuroreport* 1994b; 5:1857-1860.
  50. **Greco R, Tassorelli C, Sandrini G, Di Bella P, Busccone S, Nappi G.** Role of calcitonin gene-related peptide and substance P in different models of pain. *Cephalalgia* 2008; 28:114-126.
  51. **D'Arco M, Giniatullin R, Simonetti M, Fabbro A, Nair A, Nistri A, Fabbretti E.** Neutralization of nerve growth factor induces plasticity of ATP-sensitive P2X3 receptors of nociceptive trigeminal ganglion neurons. *Neurosci* 2007; 27:8190-8201.
  52. **Kim YS, Paik SK, Cho YS, Shin HS, Bae JY, Moritani M, Yoshida A, Ahn DK, Valtchanoff J, Hwang SJ, Moon C, Bae YC.** Expression of P2X3 receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 2008; 506:627-639.
  53. **Cadet R, Pajot J, Papon A, Woda A.** Is there a correlation between scores of nociceptive behavioral responses to formalin injections given at different body sites in the rat? *Neurosci Lett* 1998; 242:123-126.
  54. **Wheeler-Aceto H, Cowan A.** Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991; 104:35-44.
  55. **Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF.** The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 1995; 60:91-102.
  56. **Lee HJ, Choi HS, Jung CY, Ju JS, Kim SK, Bae YC, Ahn DK.** Intracisternal NMDA produces analgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 497-503.
  57. **Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN.** Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *FEBS J* 2008; 275:3514-3526.
  58. **Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H.** Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol* 2008; 510: 641-654.

- 
59. **Nishikawa T, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Kawaguchi N.** Endogenous D-serine in mammalian brains. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2000; 20:33-39.
60. **Suman-Chauhan N, Webdale L, Hill DR, Woodruff GN.** Characterisation of [<sup>3</sup>H] gabapentin binding to a novel site in the rat brain: homogenate binding studies. *Eur J Pharmacol* 1993; 244:293-301.