



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR**

Departamento de Farmacobiología

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GABA_A QUE CONTIENEN LA
SUBUNIDAD α 5 EN UN MODELO DE FIBROMIALGIA EN RATAS**

Tesis que presenta

Q.F.B. Yarim Elideth De la Luz Cuellar

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de tesis: Dr. Vinicio Granados Soto

Ciudad de México

Enero 2018

La parte experimental del presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Dolor (Laboratorio 12) del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 422756 y del proyecto CB-2012/179294, ambos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vinicio Granados Soto por permitirme formar parte del Laboratorio 12 y por todo el apoyo brindado durante la realización de la presente investigación. Gracia por confiar en mi y aceptarme con mi cabello azul.

Al Dr. José Alonso Fernández Guasti y a la Dra. Nadia Lizeth Caram Salas, por aceptar ser mis sinodales. Sus oportunos comentarios, consejos y aportaciones enriquecieron este trabajo.

A todos quienes conforman los Laboratorios 2, 4, 11 y 16 del Departamento de Farmacobiología, por facilitar el uso de sus equipos y/o reactivos para realizar mis experimentos.

A mis amigos y compañeros del Cinvestav: Aby, Mariana, Isa, Abraham, Fany, Pablo, Belen, Úrzula, Erick, Erika, Alejandro y Haza. Gracias por su apoyo, enseñanzas, risas, consejos y momentos tan divertidos.

A la M. en C. Ana Belen Salinas Abarca por su apoyo en el desarrollo experimental, especialmente la inmunohistoquímica.

A la M.B.E.I. María del Pilar Quinteros Carrillo por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

A todo el personal de bioterio, vigilancia, intendencia y administrativo que labora en el Departamento de Farmacobiología del Cinvestav, Unidad Coapa.

DEDICATORIAS

A mi mamá Irma por su cariño y el apoyo incondicional que toda la vida me ha brindado, porque siempre ha creído en mí. Gracias a ella he llegado hasta donde estoy, y es quien inspiró a dedicarme a esta línea de investigación.

A mi hermana Irmita que siempre está ahí para escucharme, por ser mi confidente y mejor amiga y porque jamás me deja caer. Te quiero mucho chuleta.

A mi hermano Chelle por esos sábados de box y cerveza, a mi hermano Olaf por esas noches de Twisted Metal. A mis cuñadas Jenny y Chivis, por formar parte de mi familia y apoyarme.

A mis sobrinos: Tayén, Faty, Josh, O-Ju y "Elmo", que me motivan a ser un buen ejemplo.

A los Vacthor: Oscar, Rubén, Gustavo y Juan Antonio, por compartir conmigo el amor a la música.

A mis amigos y a todas aquellas personas que son una parte importante en mi vida, y que por falta de espacio no están en este escrito.

A los animales de laboratorio. No hay palabras suficientes que expresen el agradecimiento a todos ellos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iv
TABLAS Y FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Dolor.....	1
1.1.1 Clasificación del dolor.....	1
1.2 Nociceptores.....	3
1.3 Transmisión nociceptiva.....	5
1.3.1 Modulación ascendente del dolor.....	6
1.3.2 Modulación descendente del dolor.....	6
1.4 Sensibilización.....	8
1.4.1 Sensibilización periférica.....	8
1.4.2 Sensibilización central.....	11
1.5 Inhibición espinal.....	14
1.5.1 Inhibición y desinhibición pre-sináptica.....	15
1.5.2 Inhibición y desinhibición post-sináptica.....	18
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	21
2.1 Síndromes de dolor funcional.....	21
2.2 Fibromialgia.....	22
2.2.1 Tratamiento de la fibromialgia.....	27
2.3 Modelos de fibromialgia en animales.....	30
2.3.1 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina en ratas.....	34
2.4 Receptores GABA _A	37
2.4.1 Receptores GABA _A y dolor.....	40
2.5 Receptores GABA _A - α 5.....	41
2.5.1 Receptores GABA _A - α 5 y dolor.....	42
3. JUSTIFICACIÓN	44
4. HIPÓTESIS	45

5. OBJETIVOS	45
5.1 Objetivo general.....	45
5.2 Objetivos particulares.....	45
6. MATERIAL Y MÉTODOS	46
6.1 Animales.....	46
6.2 Modelo de fibromialgia inducida por reserpina.....	46
6.3 Evaluación de conductas nociceptivas.....	46
6.3.1 Determinación de la alodinia táctil.....	46
6.3.2 Evaluación del umbral de presión muscular.....	47
6.4 Fármacos.....	47
6.5 <i>Knockdown</i> de los receptores GABA _A -α5.....	48
6.6 Determinación de la expresión de los receptores GABA _A -α5.....	49
6.6.1 Extracción de tejido.....	49
6.6.2 <i>Western blot</i>	49
6.7 Inmunohistoquímica.....	50
6.7.1 Obtención y preparación del tejido.....	50
6.7.2 Inmunotinción.....	51
6.8 Análisis de datos y estadística.....	52
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	53
7.1 Estandarización del modelo de fibromialgia.....	53
7.2 Evaluación farmacológica.....	53
7.3 Esquema de administración de los siRNAs.....	55
7.4 Determinación de la expresión del receptor GABA _A -α5 por <i>western blot</i>	55
7.5 Inmunohistoquímica.....	56
8. RESULTADOS	57
8.1 Caracterización del modelo de fibromialgia inducido por reserpina.....	57
8.2 Evaluación farmacológica de la contribución de los receptores GABA _A -α5 en las conductas nociceptivas en el modelo de fibromialgia.....	60
8.3 Evaluación farmacológica de la contribución de los receptores GABA _A -α5 en la nocicepción de ratas intactas.....	64

8.4 Evaluación farmacológica de los agonistas inversos del receptor GABA _A -α5 en machos reserpinizados.....	65
8.5 Efecto del <i>knockdown</i> de los receptores GABA _A -α5 sobre las conductas nociceptivas inducidas por reserpina.....	68
8.6 Determinación de la expresión de la proteína de los receptores GABA _A -α5 en el modelo de fibromialgia.....	69
8.7 Activación de la glía espinal en el modelo de fibromialgia.....	71
9. DISCUSIÓN.....	72
9.1 La reserpina produce conductas nociceptivas en ratas hembras y machos.....	72
9.2 Los receptores GABA _A -α5 participan en el mantenimiento de la hipersensibilidad inducida por reserpina.....	74
9.3 Los receptores GABA _A -α5 participan en la nocicepción de manera dependiente del sexo.....	78
9.4 La expresión de la proteína de los receptores GABA _A -α5 incrementa en el modelo de fibromialgia.....	79
9.5 La reserpina incrementa la inmunorreactividad de los marcadores de microglía y astrocitos.....	80
10. CONCLUSIONES.....	82
10.1 Conclusiones particulares.....	82
10.2 Conclusión general.....	82
11. PERSPECTIVAS.....	83
12. REFERENCIAS.....	84

ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina	EE	Error estándar
ABC	Área bajo la curva	EP₂	Receptor de prostaglandina E ₂
ACC	Corteza cingular anterior	ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ADN	Ácido ribonucleico	FDL	Funículo dorsolateral
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos	fMRI	Imágenes de resonancia magnética funcional
AMPA	Receptor del ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico	GABA	Ácido gama-aminobutírico
ANOVA	Análisis de varianza	GABA_A	Receptor ionotrópico del ácido gama-aminobutírico
ARN	Ácido ribonucleico	GABA_A-α5	Receptor GABA _A con la subunidad alfa 5
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
ASIC	Canal iónico sensor de ácido	GRD	Ganglios de la raíz dorsal
ATP	Trifosfato de adenosina	i.t.	Intratecal
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	IB4	Isolectina B4
BZ	Benzodiazepinas	IL-1β	Interleucina 1β
CamKII	Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II	IL-6	Interleucina 6
CCL2	Proteína quimioatrayente de monocitos 2	IL-8	Interleucina 8
CFA	Adyuvante completo de Freund	JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	KCC2	Co-transportador potasio-cloruro 2
COX-2	Ciclooxigenasa-2	LCR	Líquido cefalorraquídeo
DAP	Despolarización de las aferentes primarias	LTP	Potenciación a largo plazo
DMSO	Dimetil sulfóxido	MAPK	Cinasas activadas por mitógeno
DSM	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales	ME	Médula espinal
EDTA	Ácido etilendiamnotetraacético	mGlu	Receptor metabotrópico de glutamato
		NA	Noradrenalina

NAM	Modulador alostérico negativo	PVDF	Polifluoruro de vinilideno
Nav1.9	Canal de sodio dependiente de voltaje	RES	Grupo de ratas administradas con reserpina 1 mg/kg por tres días consecutivos
NGF	Factor de crecimiento nervioso	ROS	Especies reactivas de oxígeno
NK1	Receptor de neurokinina 1 o receptor de sustancia P	RRD	Reflejos de la raíz dorsal
NKCC1	Co-transportador sodio-potasio-cloruro 1	RVM	Médula rostroventromedial
NMDA	Receptor de N-metil-D-aspartato	s.c.	Subcutánea
nmol	Nanomoles	S1	Corteza somatosensorial primaria
NOS	Sintasa de óxido nítrico	S2	Corteza somatosensorial secundaria
NR1	Subunidad R1 del receptor N-metil-D-aspartato	SDS	Dodecil sulfato de sodio
NR2A	Subunidad R2A del receptor N-metil-D-aspartato	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
NR2B	Subunidad R2B del receptor N-metil-D-aspartato	siRNA	Ácido ribonucleico de interferencia pequeño
NRM	Núcleo magno de rafé	SNB	Suero normal de burro
OMS	Organización Mundial de la Salud	SNC	Sistema nervioso central
ON	Óxido nítrico	SP	Sustancia P
PAG	Sustancia gris periacueductal	STT	Somatostatina
PAM	Modulador alostérico positivo	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
PBS	Buffer de fosfatos en solución salina	TrkA	Cinasa A del receptor de tropomiosina
PCC	Corteza cingular posterior	TrkB	Cinasa B del receptor de tropomiosina
PFA	Paraformaldehído	TRPV	Receptor vaniloide de potencial transitorio
PGE₂	Prostaglandina E ₂	VEH	Grupo de ratas administradas con ácido acético al 0.5% por tres días consecutivos
PKA	Proteína cinasa A		
PKC	Proteína cinasa C		

TABLAS

Tabla 1 Tratamiento farmacológico de la fibromialgia.....	28
Tabla 2 Modelos de fibromialgia en roedores y sus hallazgos principales.....	31
Tabla 3 Farmacología de los receptores GABA _A	39
Tabla 4 Afinidad de los fármacos utilizados en este trabajo.....	48

FIGURAS

Figura 1 Los cuatro principales tipos de dolor.....	3
Figura 2 Características de los nociceptores.....	4
Figura 3 Vías y áreas cerebrales implicadas en el procesamiento del dolor.....	7
Figura 4 Sensibilización periférica.....	10
Figura 5 Sensibilización central.....	12
Figura 6 Glomérulo espinal de la inhibición pre-sináptica.....	15
Figura 7 Reflejos de la raíz dorsal.....	17
Figura 8 Desinhibición post-sináptica.....	19
Figura 9 Criterio de la ACR para el diagnóstico de la fibromialgia.....	23
Figura 10 Mecanismos propuestos en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina.....	36
Figura 11 Receptores GABA _A sinápticos y extrasinápticos.....	38
Figura 12 Diseño experimental de la evaluación conductual correspondiente a la estandarización del modelo de fibromialgia inducido por reserpina.....	53
Figura 13 Diseño experimental de la evaluación del efecto antialodínico y antihiperalgésico de los fármacos en ratas reserpinizadas.....	54
Figura 14 Diseño experimental de la evaluación del efecto antialodínico y antihiperalgésico de los fármacos en ratas <i>naïve</i>	54
Figura 15 Diseño experimental de la administración i.t. de los siRNA contra los receptores GABA _A -α5.....	55
Figura 16 Diseño experimental de la extracción de médula espinal y ganglio de la raíz dorsal para el <i>western blot</i>	56
Figura 17 Diseño experimental de la extracción de médula espinal y ganglio de la raíz dorsal para inmunohistoquímica.....	56
Figura 18 La reserpina produce alodinia táctil e hiperalgnesia muscular en ratas hembra.....	58

Figura 19 La reserpina produce alodinia táctil e hiperalgesia muscular en ratas macho.....	59
Figura 20 La reserpina produce hipersensibilidad en ratas machos y hembras de forma similar.....	60
Figura 21 Efecto de la administración intratecal de L-655,708 en la alodinia táctil e hiperalgesia muscular en ratas reserpinizadas.....	61
Figura 22 Efecto de la administración intratecal de TB21007 en la alodinia táctil e hiperalgesia muscular en ratas reserpinizadas.....	62
Figura 23 Efecto del post-tratamiento con L-838,417 sobre el efecto antialodínico producido por L-655,708 en ratas reserpinizadas.....	63
Figura 24 Efecto de la administración conjunta de L-655,708 y L-838,417 en la alodinia de ratas reserpinizadas.....	63
Figura 25 Efecto de la administración intratecal de bicuculina en comparación con el efecto de L-655,708 y TB21007 en ratas reserpinizadas.....	64
Figura 26 Efecto de la administración intratecal de L-655,708, TB21007 y bicuculina en ratas <i>naïve</i>	65
Figura 27 Efecto de la administración intratecal de L-655,708 y TB21007 sobre la alodinia de ratas hembras y machos.....	66
Figura 28 Resumen comparativo del efecto de los agonistas inversos del receptor GABA _A -α5 entre ratas hembras y machos.....	67
Figura 29 Comparación del efecto pronociceptivo de L-655,708 entre ratas hembras y machos <i>naïve</i>	67
Figura 30 Efecto del tratamiento con un siRNA dirigido a los receptores GABA _A -α5 sobre el umbral de retiro en ratas reserpinizadas.....	68
Figura 31 Efecto del tratamiento con un siRNA dirigido a los receptores GABA _A -α5 sobre el umbral de retiro en ratas <i>naïve</i>	69
Figura 32 Expresión de la proteína de los receptores GABA _A -α5 en médula espinal y GRD después de la administración de reserpina	70
Figura 33 Efecto de la administración intratecal de los agonistas inversos sobre la expresión de la proteína de los receptores GABA _A -α5 en médula espinal y GRD.....	70
Figura 34 Inmunorreactividad de los marcadores de microglía (OX-42) y astrocitos (GFAP) en la médula espinal.....	71

RESUMEN

La fibromialgia es un síndrome de dolor músculo-esquelético generalizado cuya causa se desconoce. El tratamiento actual no es efectivo en todos los pacientes y produce efectos secundarios importantes. La activación de los receptores GABA_A en las neuronas aferentes primarias causa una despolarización inhibitoria, conocida como despolarización de la aferente primaria. Esta inhibición se reduce o revierte en estados de dolor crónico. Está demostrado que los receptores GABA_A- α 5 extrasinápticos modulan la excitabilidad de las neuronas sensoriales. Además, estos receptores se expresan en el ganglio de la raíz dorsal y la médula espinal de roedores, sugiriendo que desempeñan un papel relevante en el dolor. El propósito de este estudio fue evaluar la participación de los receptores GABA_A- α 5 en un modelo de fibromialgia inducido por reserpina en ratas. La administración de reserpina (1 mg/kg, s.c.) en ratas Wistar hembras y machos por 3 días consecutivos produjo alodinia táctil e hiperalgesia muscular 7 días después de la última inyección en ambas patas traseras. La administración i.t. de L-655,708 (0.15-15 nmol) o TB21007 (1.5-150 nmol), agonistas inversos selectivos de los receptores GABA_A- α 5, revirtió la alodinia táctil y parcialmente la hiperalgesia muscular producidas por la reserpina de manera dosis dependiente en ratas hembra. Sin embargo, el efecto de estos fármacos fue menor en ratas macho. A su vez, la inyección i.t. de L-838,417, agonista parcial de los receptores GABA_A- α 2, - α 3 y - α 5, revirtió el efecto antialodínico producido por el L-655,708. Por otro lado, el tratamiento i.t. con un siRNA dirigido a los receptores GABA_A- α 5 también atenuó la alodinia producida en el modelo y disminuyó el umbral de retiro en ratas intactas. La administración de reserpina incrementó la expresión de la proteína de los receptores GABA_A- α 5 en médula espinal y ganglio de la raíz dorsal. Los agonistas inversos redujeron la expresión del receptor GABA_A- α 5 en ambos sitios. La reserpina aumentó la inmunorreactividad de OX-42 y GFAP en la médula espinal de la rata. Estos datos sugieren que los receptores GABA_A- α 5 espinales contribuyen a la hipersensibilidad (alodinia táctil e hiperalgesia muscular) observada en este modelo de fibromialgia en ratas.

ABSTRACT

Fibromyalgia is a chronic widespread musculoskeletal pain syndrome for which no alternative cause has been identified. The current treatment is not effective in all patients and it produces important side effects. Activation of GABA_A receptors in primary afferent fibers causes an inhibitory depolarization known as primary afferent depolarization. This inhibition is reduced or reversed in chronic pain states. It has been demonstrated that extrasynaptic α_5 subunit-containing GABA_A (α_5 -GABA_A) receptors modulate excitability of sensory neurons. In addition, these receptors are expressed in the dorsal root ganglion and spinal cord of rodents, suggesting an important role in pain. The purpose of this study was to investigate the possible participation of spinal α_5 -GABA_A receptors in a reserpine-induced model of fibromyalgia in rats. Reserpine (1 mg/kg, s.c.) injection in adult female and male Wistar rats for 3 consecutive days produced tactile allodynia and muscle hyperalgesia 7 days after its last injection in both hind paws. Intrathecal administration of L-655,708 (0.15-15 nmol) or TB21007 (1.5-150 nmol), selective α_5 -GABA_A receptor inverse agonists, but not vehicle, reversed tactile allodynia and partially reversed muscle hyperalgesia produced by reserpine in a dose-dependent manner on female rats. In male rats, the effect of these drugs was lower. In addition, i.t. injection of L-838,417, a GABA_A- α_2 , - α_3 and - α_5 receptor partial agonist, reversed the anti-allodynic effect of L-655,708. Furthermore, i.t. siRNA against α_5 -GABA_A receptors attenuated allodynia on reserpinized rats, and decreased the withdrawal threshold on intact rats. Moreover, reserpine injection increased the expression of α_5 -GABA_A receptor protein in spinal cord and dorsal root ganglia. Inverse agonists reduced expression of α_5 -GABA_A receptors in both sites. Reserpine enhanced immunoreactivity of OX-42 and GFAP in the spinal cord. These data suggest that spinal α_5 -GABA_A receptors contribute to the hypersensitivity (tactile allodynia and muscle hyperalgesia) observed in this model of fibromyalgia in the rat.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dolor

El dolor es una respuesta del organismo ante estímulos físicos, químicos o mecánicos que ponen en riesgo su integridad. Se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular real o potencial, y que puede ser descrita en términos de la magnitud de dicho daño (Merskey, 1994). Por lo tanto, el dolor es una sensación multidimensional con fuertes componentes cognitivos y emocionales que puede variar en intensidad (leve, moderado o severo), calidad (agudo, quemante, continuo), duración (transitorio, intermitente o persistente) y referencia (superficial, profundo, localizado o difuso) (Woolf, 2004).

El dolor es un problema de salud pública que afecta a toda la población independientemente de la edad, género o etnia. Se calcula que alrededor del 20% de la población adulta en el mundo sufre algún tipo de dolor. El dolor suele ser la primera causa de visita al médico. Además, el dolor crónico puede influir en otros aspectos de la salud y en el ámbito social generando depresión, problemas de sueño, incapacidad laboral y aislamiento social, entre otros (Goldsberg y McGee, 2011). En México no existen estudios epidemiológicos oficiales, pero se estima que alrededor de 28 millones de personas desarrollaron dolor crónico en el 2010 (Covarrubias-Gómez *et al.*, 2010).

1.1.1 Clasificación del dolor

En condiciones normales, el dolor funciona como un sistema de protección que detecta estímulos nocivos y minimiza el contacto con estos. Sin embargo, en condiciones patológicas el dolor no es protector: los procesos y las estructuras sensoriales que lo conforman se ven afectados, se vuelve crónico y no adaptativo (Woolf, 2010). Considerando lo anterior, el dolor se clasifica de acuerdo a la duración y características fisiopatológicas que lo producen (Woolf, 2004; Woolf, 2010) (**Figura 1**):

- **Dolor nociceptivo:** Este tipo de dolor se produce por la activación de los nociceptores cutáneos de alto umbral en ausencia de daño tisular. El dolor nociceptivo es esencial para detectar y minimizar el contacto con estímulos

potencialmente dañinos, por lo que implica una respuesta autonómica y un reflejo de retirada.

- **Dolor inflamatorio:** El dolor inflamatorio se produce en presencia de daño tisular que estimula la activación del sistema inmune y la subsecuente disminución del umbral de activación de las fibras aferentes primarias. El dolor inflamatorio es adaptativo. La sensibilidad de la parte afectada aumenta y de esta manera se previene el contacto físico o movimiento hasta su recuperación.
- **Dolor neuropático:** Este tipo de dolor surge como respuesta al daño en el tejido nervioso tanto a nivel periférico como central y puede persistir durante meses o años. El tratamiento médico suele ser inefectivo, lo que reduce considerablemente la calidad de vida de los pacientes.
- **Dolor funcional:** El dolor funcional (o también llamado disfuncional) se considera un tipo de dolor no adaptativo donde no existe inflamación aparente ni daño al tejido o los nervios. Se cree que el aumento de la sensibilidad y la percepción del dolor ocurren en respuesta a un procesamiento anormal en el sistema nervioso central (SNC).

Aunque se generan por distintas causas, el dolor inflamatorio, el neuropático y el funcional comparten características que los diferencian del dolor nociceptivo. Tales características son consecuencia de la alteración en el procesamiento sensorial nociceptivo, entre las que destacan la actividad espontánea de los nociceptores, la alodinia (dolor ocasionado por un estímulo inocuo) y la hiperalgesia (respuesta exagerada a un estímulo doloroso) (Merskey, 1994; Woolf, 2004).

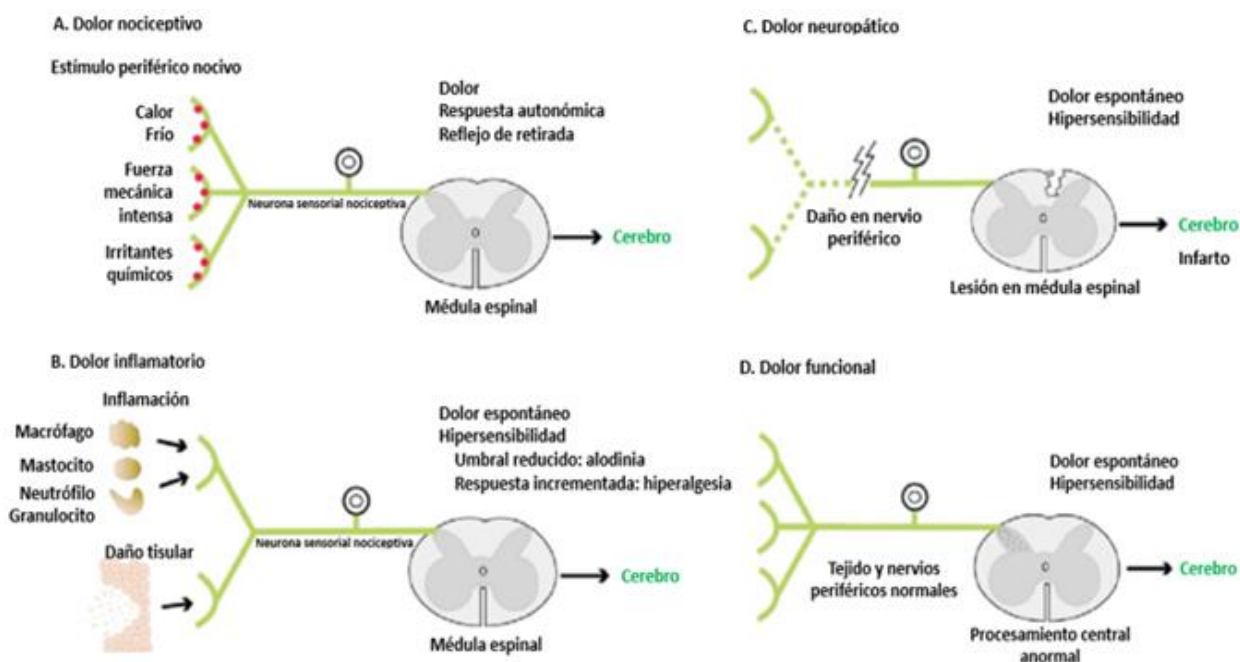


Figura 1. Los cuatro principales tipos de dolor. Modificado de Woolf *et al.*, 2004.

1.2 Nociceptores

La nocicepción es el proceso mediante el cual los organismos detectan estímulos intensos (térmicos, mecánicos o químicos) a través de una subpoblación de fibras nerviosas periféricas denominadas nociceptores (Basbaum y Jessell, 2000) (**Figura 2a**). Los cuerpos celulares de los nociceptores se localizan en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) o en el ganglio trigeminal, tienen un axón que se bifurca en una terminal periférica que inerva al órgano blanco y una terminal central que hace sinapsis en la médula espinal con neuronas de segundo orden (Woolf y Ma, 2007; Basbaum *et al.*, 2009). Los nociceptores son capaces de diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos, ya que tienen un alto umbral de activación que les permite codificar la intensidad de un estímulo hasta considerarlo perjudicial gracias a sus propiedades biofísicas y moleculares (Cervero y Laird, 1999; Woolf y Ma, 2007; Basbaum *et al.* 2009). La velocidad de transmisión de los estímulos nociceptivos está directamente relacionada al diámetro de los axones de los nociceptores, y si están o no mielinizados (**Figura 2a y b**).

La mayoría de los nociceptores son de diámetro pequeño (0.4-1.4 μm) y no mielinizados (fibras C) que poseen una velocidad de conducción de 0.4-1.4 m/s. Las fibras A δ modulan

el dolor inicial a través de nociceptores de diámetro mediano (6-10 μm), son ligeramente mielinizadas y su velocidad de conducción es de 5-30 m/s. Las fibras $A\beta$ son de diámetro grande (10-30 μm), son responsables de la propiocepción y el tacto ligero, están mielinizadas y su velocidad de conducción es de 30-100 m/s (Gold y Gebhart 2010; Dubin y Patapoutian, 2010).

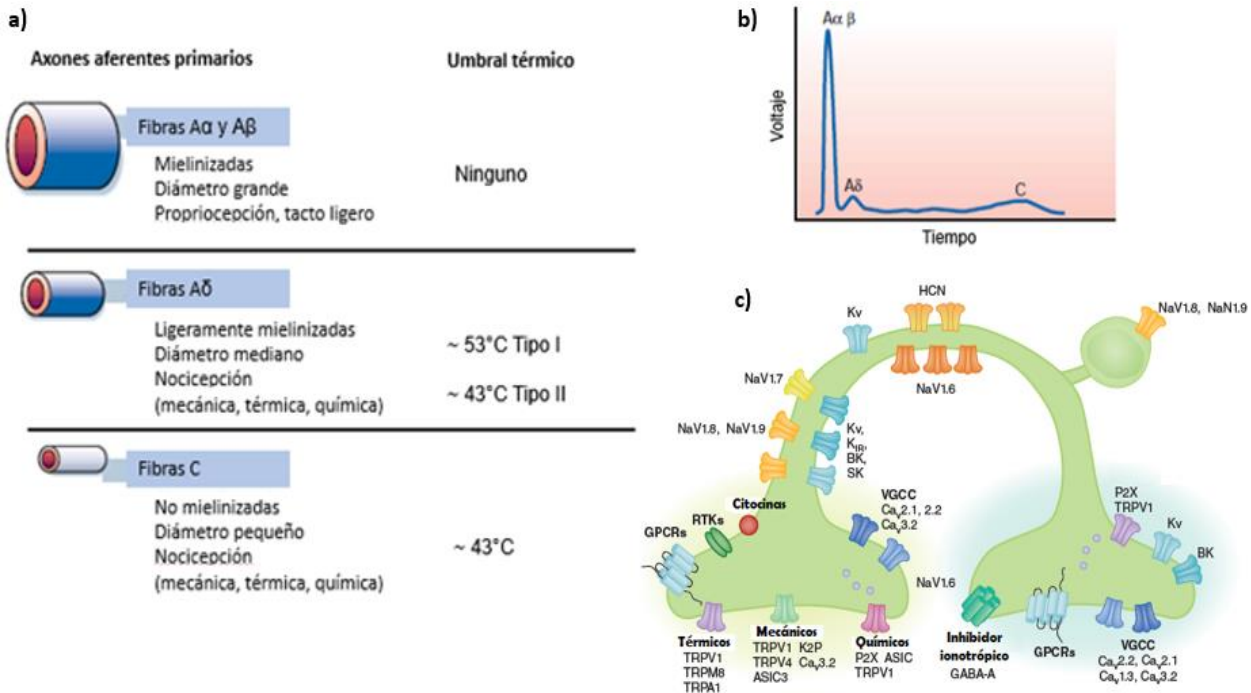


Figura 2. Características de los nociceptores. **a)** Clasificación de los nociceptores. Nervios periféricos que incluyen fibras de diámetro grande ($A\alpha$ y $A\beta$), diámetro mediano ($A\delta$) y fibras no mielinizadas de pequeño diámetro (C); **b)** Registro de un potencial de acción de un nervio periférico que refleja la relación directa entre la velocidad de conducción y el tamaño de la fibra. La mayoría de los nociceptores son fibras $A\delta$ o C, cuyas velocidades de conducción son de 6-30 y – 1 m/s, respectivamente; **c)** Las fibras C son nociceptores polimodales, es decir, responden a estímulos nocivos térmicos, mecánicos y químicos debido a la participación de múltiples receptores específicos. Modificado de Julius y Basbaum, 2001.

La caracterización molecular y anatómica de las fibras C las divide en dos tipos principales: peptidérgicas y no peptidérgicas. Las neuronas peptidérgicas se caracterizan por contener neuropéptidos como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la somatostatina (STT) (Ringkamp *et al.*, 2013). Además, expresan de manera específica la cinasa A del receptor de tropomiosina (TrkA), que responde al factor de crecimiento nervioso (NGF), y también los canales TRPV1, TRPV2, TRPA1 y TRPM8 (Woolf y Ma, 2007). Este tipo de fibras se insertan principalmente en la lámina I y la lámina II externa del asta dorsal de la médula espinal (Julius y Basbaum, 2001).

Por su parte, las neuronas no peptidérgicas no contienen péptidos, pero se unen selectivamente a la isolectina B4 (IB4) de la planta *Griffonia simplicifolia* (Ringkamp *et al.*, 2013) y expresan específicamente los receptores del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el receptor purinérgico P2X₃ y los canales TRPC3 y Nav1.9 (Woolf y Ma, 2007). Las terminales centrales de las neuronas no peptidérgicas proyectan principalmente en la lámina II externa del asta dorsal (Ringkamp *et al.*, 2013).

1.3 Transmisión nociceptiva

El proceso que conduce a la percepción del dolor comienza con la activación de los nociceptores (principalmente fibras C y A δ) por estímulos nocivos que se traducen en estímulos eléctricos conocidos como potenciales de acción. Esto implica la participación de receptores específicos y canales iónicos, cuya expresión diferencial puede distinguir a los nociceptores que son sensibles al calor (TRPV1), al frío (TRPM8), a ambientes ácidos (ASICs) o a irritantes químicos (TRPA1) (Julius y Basbaum, 2001), entre otros estímulos (**Figura 2c**). Los potenciales de acción se propagan a través de las fibras aferentes primarias hasta las terminales centrales, localizadas en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal (Woolf 2004; Julius y Basbaum, 2001). La llegada del potencial de acción a la terminal central provoca la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, permitiendo el aumento del Ca²⁺ intracelular que induce la liberación de mediadores como glutamato (principalmente), aspartato, SP, CGRP y STT en el espacio sináptico, lo que produce una amplificación en la transmisión del dolor. Cuando estos mediadores activan a sus respectivos receptores en la neurona postsináptica de segundo orden, la información nociceptiva se envía a través de vías espinales hacia centros superiores capaces de involucrar varios procesos de percepción del dolor (modulación ascendente), que a su vez pueden provocar la reacción de sistemas de control que atenúan selectivamente algunas respuestas relacionadas con el dolor en la médula espinal (modulación descendente) (Julius y Basbaum, 2001; Woolf 2004; Pertovaara y Almeida, 2006).

1.3.1 Modulación ascendente del dolor

La información nociceptiva asciende al tálamo a través de neuronas de segundo orden del tracto espinotalámico, y al tallo cerebral mediante los tractos espinoreticular (espinoparabraquial) y espinomesencefálico. El tracto espinotalámico lateral llega directamente al núcleo ventral posterior del tálamo, mientras que el tracto espinotalámico medial envía proyecciones colaterales a la sustancia gris periacueductal (PAG) y al sistema reticular en el mesencéfalo (**Figura 3**) antes de alcanzar el núcleo medial del tálamo (Tracey y Mantyh, 2007). Las neuronas de tercer orden, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el tálamo, proyectan hacia la corteza somatosensorial primaria y secundaria (S1 y S2), responsables de la discriminación sensorial del dolor (intensidad, localización, calidad), y hacia áreas del sistema límbico-cortical involucradas en la modulación del componente aversivo-emocional del dolor, como la corteza cingular anterior (ACC) y la corteza insular (Brodin *et al.*, 2016).

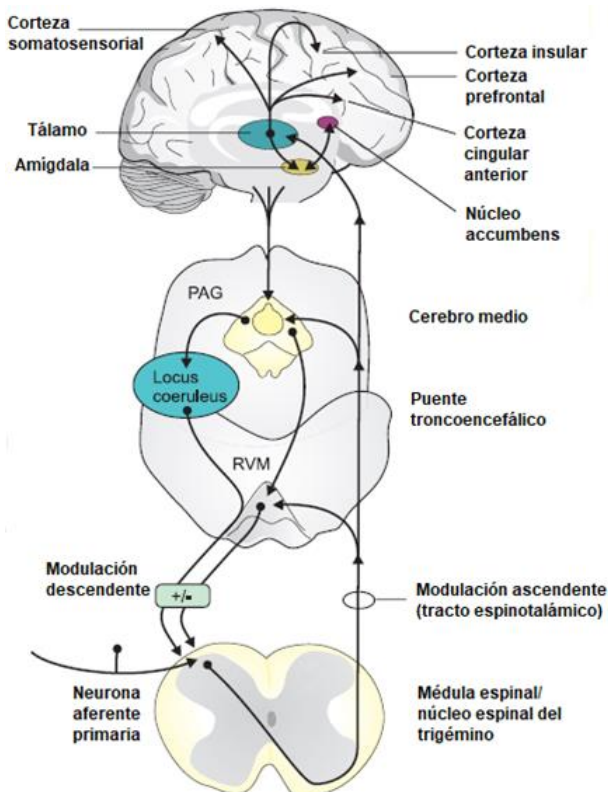
Por otro lado, el tracto espinoreticular surge de las láminas profundas del asta dorsal y envía proyecciones a la formación reticular, que a su vez envía proyecciones a la amígdala y otras áreas asociadas en el procesamiento emocional y cognitivo del dolor, como el núcleo accumbens, el hipocampo y la corteza prefrontal (Tracey y Mantyh, 2007; Brodin *et al.*, 2016). Las proyecciones espinales hacia el tallo cerebral son particularmente importantes para integrar la actividad nociceptiva con procesos homeostáticos y autonómicos (Tracey y Mantyh, 2007).

1.3.2 Modulación descendente del dolor

El sistema endógeno de modulación del dolor se lleva a cabo a través de un circuito descendente de áreas corticales y subcorticales que consiste en dos estructuras principales: la PAG y la médula rostroventromedial (RVM) (Vanegas y Schaible, 2004; Pertovaara y Almeida, 2006; Ossipov *et al.*, 2010; Ossipov *et al.*, 2014). Los impulsos generados en el hipotálamo, tálamo, amígdala y corteza cingular anterior se integran en la PAG, que envía proyecciones a la RVM, que a su vez envía proyecciones a lo largo del funículo dorsolateral (FDL) a la médula espinal (**Figura 3**). La RVM se conforma por el núcleo magno de rafé (NRM) y formaciones reticulares adyacentes serotoninérgicas

(Ossipov *et al.*, 2010), así como de poblaciones de neuronas GABAérgicas y glicinérgicas (Kato *et al.* 2006; Hossaini *et al.* 2012), todas con proyecciones hacia la médula espinal. La RVM también recibe entradas del tálamo, la región parabraquial y el *locus coeruleus* a través de neuronas noradrenérgicas, las cuales comunican con la PAG (Ossipov *et al.*, 2010; Ossipov *et al.*, 2014).

Figura 3. Vías y áreas cerebrales implicadas en el procesamiento del dolor. Las neuronas aferentes primarias, cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal o el ganglio trigémino, se acoplan con neuronas



secundarias en el asta dorsal de la médula espinal, o en el núcleo espinal del trigémino. Los axones de las neuronas de segundo orden proyectan hacia el tálamo y áreas subcorticales como RVM y PAG. Las neuronas de tercer orden proyectan desde el tálamo hacia la corteza somatosensorial y áreas límbicas corticales; también proyectan hacia la amígdala, que a su vez interactúa con el núcleo accumbens. Varias de estas regiones cerebrales envían proyecciones moduladoras descendentes a través de la PAG-RVM y el *locus coeruleus*, de vuelta hasta las primeras sinapsis en las neuronas aferentes primarias. PAG=sustancia gris periacueductal; RVM=médula rostroventromedial. Modificado de Brodin *et al.*, 2016.

La modulación descendente del dolor puede ser tanto inhibitoria como facilitadora, ya que la estimulación o inactivación de las neuronas de la RVM pueden suprimir o incrementar la nocicepción (Vanegas y Schaible, 2004; Heinricher *et al.*, 2009). Estudios electrofisiológicos donde se realizó la prueba del *tail-flick* ante un estímulo de calor nocivo en ratas anestesiadas (Fields *et al.*, 1976; Fields *et al.*, 1977; Anderson *et al.*, 1977)

llevaron a la identificación de una población de neuronas de la RVM que incrementan el disparo de potenciales de acción justo antes del comienzo del reflejo nociceptivo, así como otra población de neuronas que reduce el disparo. Para comprender el efecto modulador bidireccional de la RVM, las células de esta estructura se han clasificado como *ON*, *OFF* y *NEUTRAS* (Heinricher *et al.*, 2009). Por lo tanto, las células *OFF* están tónicamente activas e inhiben la transmisión nociceptiva y las células *ON* facilitan la transmisión del dolor, mientras que las células *NEUTRAS* no parecen responder ante estímulos nociceptivos (Ossipov *et al.*, 2010). La existencia de neuronas *ON* y *OFF* sugiere que los sistemas descendentes inhibidores y facilitadores funcionan en armonía para mantener un procesamiento sensorial equilibrado. Se cree que en condiciones patológicas este balance podrían alterarse, favoreciendo la facilitación e incrementando la percepción del dolor (Vanegas y Schaible, 2004).

1.4 Sensibilización

La sensibilización es un fenómeno que produce aumentos prolongados en la excitabilidad de las neuronas, y por ende, la intensidad con la que se perciben los estímulos dolorosos también incrementa. Esto puede desarrollarse a través de mecanismos periféricos (sensibilización periférica) o como consecuencia de cambios en la plasticidad neuronal en el SNC (sensibilización central) (Staud, 2012).

1.4.1 Sensibilización periférica

La sensibilización periférica es una forma de plasticidad que depende de los estímulos detectados en las fibras aferentes primarias (Basbaum *et al.*, 2009). El daño o la inflamación de los tejidos generan cambios importantes en el ambiente químico de las terminales periféricas de los nociceptores. La lesión tisular induce la infiltración de células del sistema inmune como células cebadas, plaquetas, basófilos, neutrófilos, macrófagos y fibroblastos. Estas células junto con las células residentes dañadas liberan mediadores inflamatorios como citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α), quimiocinas (CCL2), serotonina, prostaglandinas, proteasas, protones, ATP, óxido nítrico (ON), bradicinina y factores de crecimiento, entre otros (Levine y Reichling, 1999). Estos mediadores actúan sobre sus

respectivos receptores en las terminales de las aferentes primarias, induciendo la activación de segundos mensajeros y múltiples cascadas de señalización que involucran a las proteínas cinasas A (PKA) y C (PKC) y a las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) ERK, JNK y p38. La activación de estas vías de señalización genera un aumento de la transcripción de genes y de la síntesis de receptores como TRPV1 y canales de sodio dependientes de voltaje (Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9), principalmente. Los receptores son transportados a la membrana celular de las aferentes primarias, donde son fosforilados por cinasas, provocando la alteración de su umbral de activación y cinética. Esto aumenta las corrientes de sodio en la terminal periférica y la excitabilidad de la membrana, de manera que un estímulo despolarizante produce más potenciales de acción de los que normalmente se producen en la terminal nociceptiva (Woolf y Ma, 2007; Stein *et al.*, 2009; Basbaum *et al.*, 2009) (**Figura 4**).

Los mediadores pueden producir directamente dolor, pero la mayoría de ellos sensibiliza a la terminal periférica (Woolf, 2004). La producción de prostanoïdes proinflamatorios en el tejido dañado resulta de la generación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. La enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) convierte el ácido araquidónico en prostaglandina H, que posteriormente es convertida en prostanoïdes específicos como la prostaglandina E₂ (PGE₂) (Levine y Reichling, 1999). La PGE₂ y otros mediadores como serotonina y bradicinina contribuyen al aumento de la excitabilidad provocando la entrada de Ca²⁺ a las neuronas sensoriales, lo cual activa a la PKC (Linhart *et al.*, 2003). Por su parte, la PGE₂ se une a receptores como el EP₂, los cuales se encuentran acoplados a cinasas intracelulares como PKA y PKC (Levine y Reichling, 1999). Estas cinasas fosforilan los aminoácidos serina y treonina de muchos canales y receptores alterando dramáticamente su actividad, de manera que se vuelven hipersensibles ante estímulos subsecuentes (Woolf, 2004).

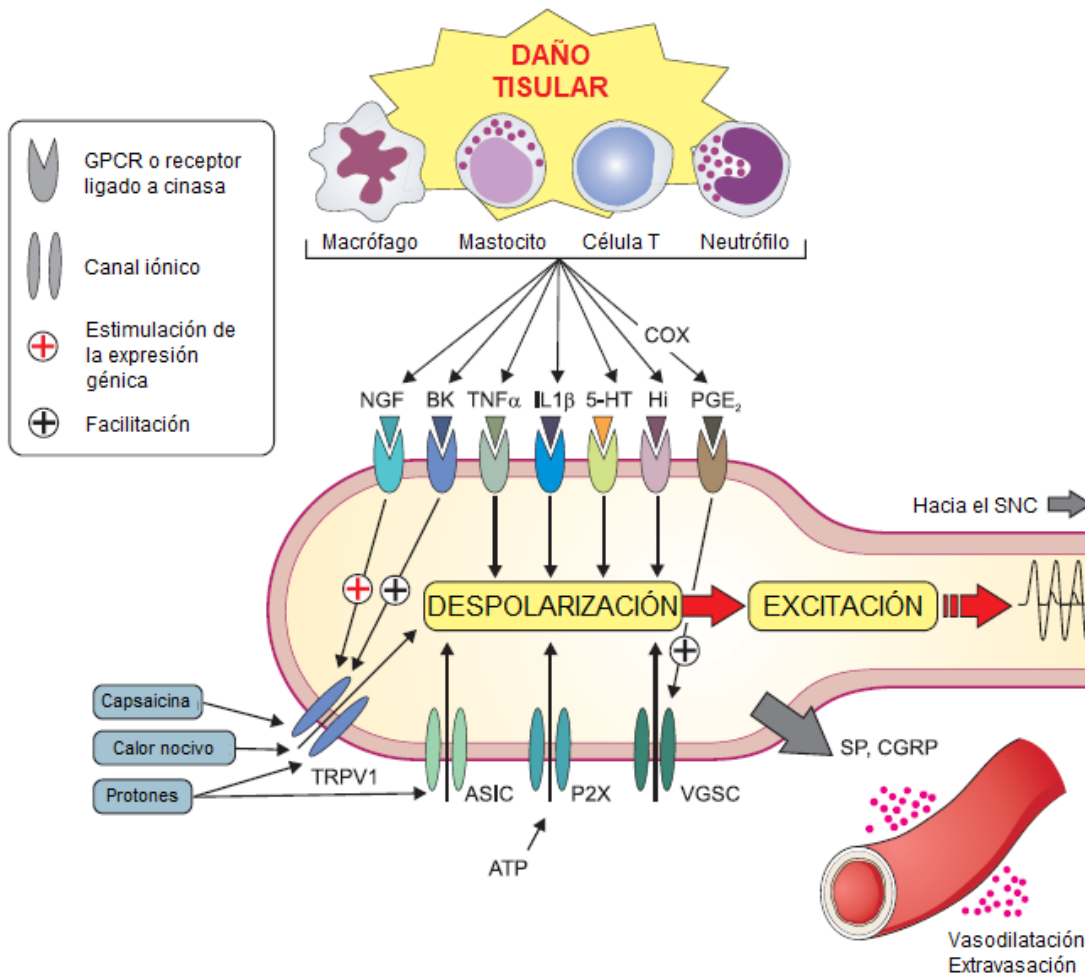


Figura 4. Sensibilización periférica. El daño al tejido desencadena la liberación de mediadores inflamatorios debido a la ruptura de las células y la activación de células especializadas del sistema inmune que se infiltran al sitio de lesión. Estos mediadores actúan sobre sus receptores ubicados en las terminales de las aferentes primarias, incrementando la despolarización y excitación de las neuronas y alterando la regulación de genes a largo plazo. Modificado de Brodin *et al.*, 2016.

Por otro lado, la activación de los nociceptores puede generar potenciales de acción ortodrómicos y antidrómicos que producen la liberación de neuropéptidos como SP y CGRP de sus terminales. Estos péptidos despolarizan las terminales nerviosas vecinas y son responsables de la vasodilatación y extravasación plasmática. Esto último recluta más células del sistema inmune, perpetuando la inflamación y la hiperexcitabilidad (Costigan y Woolf, 2000). Además, está demostrado que el glutamato que se libera de las neuronas sensoriales primarias activa a los receptores NMDA expresados en células satélite, las cuales liberan citocinas y mediadores inflamatorios que contribuyen al proceso de sensibilización (Ferrari *et al.* 2014).

La inflamación persistente en las terminales periféricas genera todos estos cambios que incrementan la transmisión nociceptiva y la sensibilidad, los cuales pueden contribuir al desarrollo de sensibilización en las terminales centrales (Costigan y Woolf, 2000; Woolf y Ma, 2007).

1.4.2 Sensibilización central

La sensibilización central es un proceso de amplificación de la transmisión nociceptiva entre la terminal central de las neuronas sensoriales y las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, consecuencia de la estimulación repetida de la terminal periférica de las aferentes primarias (Julius y Basbaum, 2001). Los mecanismos que contribuyen al establecimiento de la sensibilización central se componen de dos fases: la primera es la responsable de los cambios rápidos en la médula espinal y deriva de la activación y fosforilación de receptores; la segunda fase es de larga duración, depende de la transcripción de genes y es responsable del incremento en la expresión y el tráfico de receptores a la membrana. Ambas fases involucran una alteración en la transmisión glutamatérgica (Costigan y Woolf, 2000; Latremoliere y Woolf, 2009).

Los estímulos continuos y repetidos que activan a las fibras C generan un incremento en el número de potenciales de acción y de la entrada de Ca^{2+} , lo cual produce un fenómeno de facilitación sináptica en la terminal central de la aferente primaria conocido como *wind-up* (Latremoliere y Woolf, 2009). La terminal central de las fibras aferentes primarias sensibilizadas libera neuromoduladores como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), glutamato, SP, CGRP, ON, ATP y bradicinina (Costigan y Woolf, 2000; Basbaum *et al.*, 2009). El glutamato activa a los receptores AMPA, lo que permite la entrada de Na^+ que despolariza a las neuronas postsinápticas. Esta despolarización remueve el ion Mg^{2+} que bloquea al receptor NMDA. La activación de estos receptores ionotrópicos por parte del glutamato (NMDA, AMPA), junto con la activación de receptores metabotrópicos (mGlu, NK1) o receptores tirosina cinasa (TrkB) por parte de los otros neuromoduladores excitadores, permite la entrada de Ca^{2+} y el inicio de múltiples cascadas de señalización que originan modificaciones en las corrientes iónicas, en las propiedades de los receptores y en la expresión de sus genes (**Figura 5**) (Latremoliere y Woolf, 2009). El

aumento del Ca^{2+} intracelular estimula la activación de cinasas (PKA, PKC, Src, ERK, CamKII) que fosforilan a los receptores postsinápticos y de esta manera incrementan la excitabilidad de las neuronas (Costigan y Woolf, 2000; Latremoliere y Woolf, 2009). Por ejemplo, la cinasa Src fosforila principalmente a las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA, lo cual contribuye a que este permanezca más tiempo activo (Costigan y Woolf, 2000).

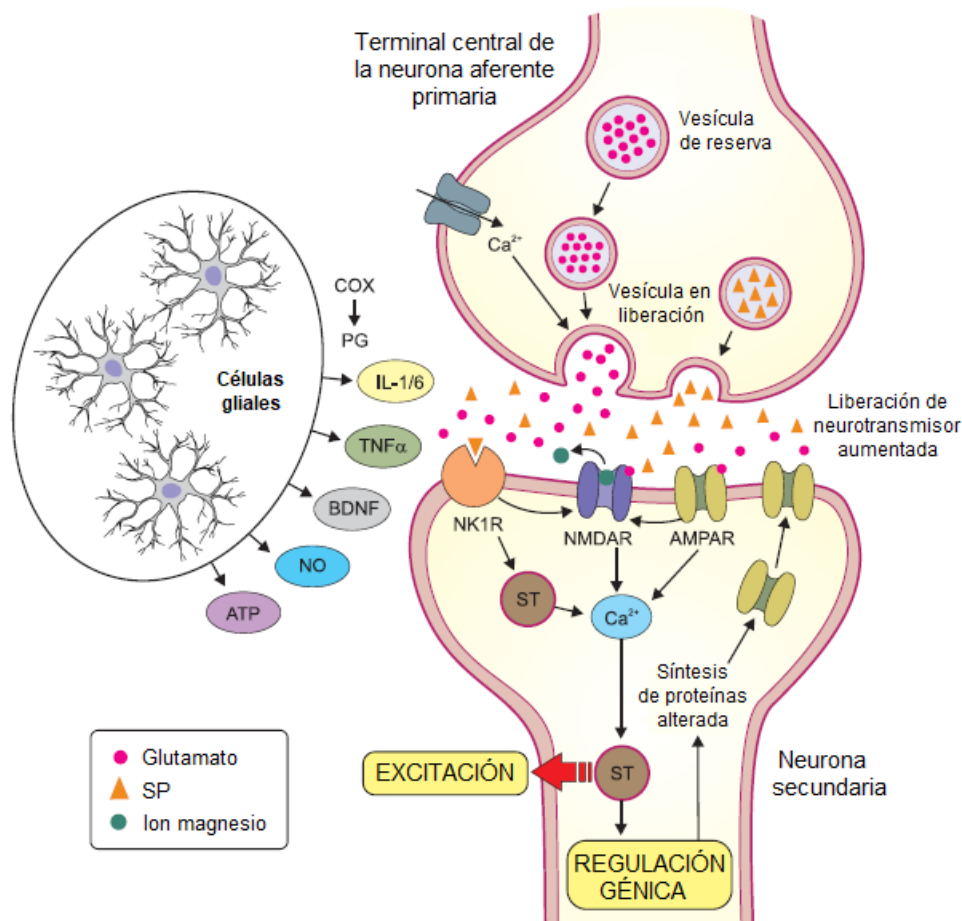


Figura 5. Sensibilización central. La inducción de la sensibilización central se debe principalmente a la potenciación sináptica entre las terminales centrales de las neuronas aferentes primarias (arriba) y las neuronas secundarias en el asta dorsal de la médula espinal (abajo). El aumento del Ca^{2+} intracelular con la llegada del potencial de acción facilita la liberación de neurotransmisores excitadores como glutamato y SP; el glutamato actúa sobre los receptores NMDA y AMPA, que incrementan directamente el flujo de Ca^{2+} en la neurona postsináptica, mientras que la SP actúa sobre los receptores NK1R e incrementan el Ca^{2+} a través de vías de transducción de señales. La despolarización remueve el ion Mg^{2+} que bloquea normalmente al receptor NMDA, permitiendo un incremento en el flujo de Ca^{2+} . Esto aumenta la excitabilidad de la neurona secundaria y altera la regulación génica a través de cascadas de señalización. Los astrocitos y la microglía también facilitan la hiperexcitabilidad liberando mediadores proinflamatorios que sensibilizan la neurona postsináptica. ST=transducción de señales. Modificado de Brodin *et al.*, 2016.

Por otro lado, el aumento de Ca^{2+} intracelular también promueve la activación de enzimas como la sintasa de óxido nítrico (NOS) y la COX-2, resultando en la producción de ON y PGE_2 , los cuales actúan a nivel pre- y post-sináptico induciendo una despolarización directa en terminales periféricas y centrales de las aferentes primarias (Costigan y Woolf, 2000; Latremoliere y Woolf, 2009).

La sensibilización central también puede involucrar una disminución de la síntesis de GABA y de la transmisión inhibitoria mediada por la pérdida de interneuronas GABAérgicas en el asta dorsal de la médula espinal (von Hehn *et al.*, 2012). Además, las células de la glía espinal (microglía y astrocitos) también contribuyen al establecimiento de la sensibilización (Suter *et al.*, 2007; Milligan y Watkins, 2009; Gosselin *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2013b). Después del daño o la inflamación, los factores liberados de la terminal central de las neuronas aferentes primarias como el ATP (Suter *et al.*, 2007), la fractalcina (CX3CL1, Zhuang *et al.*, 2007) y el factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (CSF1, Guan *et al.*, 2016) activan a la microglía y/o a los astrocitos espinales. Estos sintetizan y secretan citocinas (IL-1, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, NGF) que activan a sus receptores sobre las terminales post-sinápticas y favorecen la hiperexcitabilidad neuronal (Sharif-Naeini y Basbaum, 2011; Ji *et al.*, 2014) (**Figura 5**). Otros neuromoduladores que son liberados por la glía incluyen productos de la COX, ON, ATP, BDNF, D-serina y glutamato, los cuales aumentan la entrada de Ca^{2+} en las neuronas de la médula espinal y estimulan la fosforilación de receptores y canales, incrementando su actividad y generando un círculo de hiperexcitabilidad (Ji *et al.*, 2013b). A su vez, las quimiocinas liberadas por los astrocitos (CCL2, CCL7) activan a la microglía y contribuyen a la sensibilización central (Ji *et al.*, 2014).

Todos estos mecanismos que incrementan la excitabilidad neuronal sustentan el establecimiento de la sensibilización central (Costigan y Woolf, 2000; Woolf y Ma, 2007). Esta hiperexcitabilidad conlleva al desarrollo de plasticidad neuronal que genera potenciación a largo plazo (LTP), similar a la que subyace a otros procesos como el aprendizaje y la memoria (Sharif-Naeini y Basbaum, 2011).

1.5 Inhibición espinal

El procesamiento de la información sensorial en el SNC depende indispensablemente de la transmisión sináptica inhibitoria (Zeilhofer *et al.*, 2012b). La importancia de la inhibición en el dolor se estableció con la “teoría del control de la compuerta” (Melzack y Wall, 1965). Esta teoría propone que en las neuronas de proyección del asta dorsal, la activación de las neuronas aferentes de diámetro grande (fibras A β) pueden reducir la transmisión de impulsos en las neuronas de diámetro pequeño (fibras C), y por lo tanto reducir el dolor (Melzack y Wall, 1965; Price *et al.*, 2009). La teoría sugiere que la información sensorial nociceptiva se encuentra bajo el control de mecanismos pre- y post-sinápticos inhibitorios en la médula espinal (Chen *et al.*, 2014a).

Tanto la inhibición pre-sináptica como la post-sináptica dependen de interneuronas inhibitorias locales y fibras descendentes, que modulan la información sensorial antes de enviarla hacia centros superiores y otras regiones de la médula espinal (Zeilhofer *et al.*, 2012b). La mayoría de estas interneuronas tiene axones que forman sinapsis axodendríticas o axo-somáticas con neuronas post-sinápticas, y algunas otras forman sinapsis axo-axónicas con las terminales centrales de las fibras aferentes primarias (Zeilhofer *et al.*, 2012a). Las interneuronas inhibitorias utilizan ácido γ -aminobutírico (GABA) o glicina como neurotransmisores y representan alrededor del 40% de las neuronas localizadas en el asta dorsal de la médula espinal. De estas, las interneuronas GABAérgicas predominan en las láminas I y II, mientras que las glicinérgicas prevalecen en el borde entre las láminas II y III (Bardoni *et al.*, 2013). El GABA y la glicina actúan sobre sus respectivos receptores localizados en las neuronas de proyección, mientras que únicamente GABA actúa en receptores pre-sinápticos localizados en las terminales centrales de las aferentes primarias (Chen *et al.*, 2014a; Price y Prescott, 2015).

La activación de los receptores GABA_A (principalmente) y glicinérgicos disminuye la excitabilidad neuronal mediante dos mecanismos: hiperpolarizar la membrana post-sináptica y/o generar conductancias que producen un corto circuito de la membrana pre-sináptica, reduciendo la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato (Bardoni *et al.*, 2013). La actividad de estos receptores depende del gradiente de cloruro (Cl⁻) a través de la membrana (Price *et al.*, 2009). De esta manera, los receptores GABA_A localizados en las terminales de las aferentes primarias modulan la entrada nociceptiva

de las neuronas del GRD hacia las neuronas de proyección (inhibición pre-sináptica), mientras que los receptores GABA_A ubicados en las neuronas de la médula espinal reducen directamente la excitabilidad (inhibición post-sináptica) (Chen *et al.*, 2014a; Guo y Hu, 2014).

El bloqueo farmacológico de los receptores GABA_A reproduce las características del dolor persistente (alodinia mecánica, hiperalgesia y dolor espontáneo) (Zeilhofer *et al.*, 2012b; Price y Prescott, 2015). Existe evidencia de que la inhibición sináptica GABAérgica disminuye patológicamente en condiciones de dolor crónico, sobre todo en dolor neuropático (Coull *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2007;) e inflamación persistente (Müller *et al.*, 2003; Zeilhofer, 2008; Zeilhofer y Zeilhofer, 2008).

1.5.1 Inhibición y desinhibición pre-sináptica

En el asta dorsal de la médula espinal, la inhibición pre-sináptica ocurre en forma de sinapsis axo-axónicas simples o de arreglos sinápticos complejos denominados glomérulos sinápticos (**Figura 6**). Estos glomérulos están conformados por las terminales axónicas de las interneuronas y las dendritas post-sinápticas que rodean la terminal central de la aferente primaria (Zeilhofer *et al.*, 2012a).

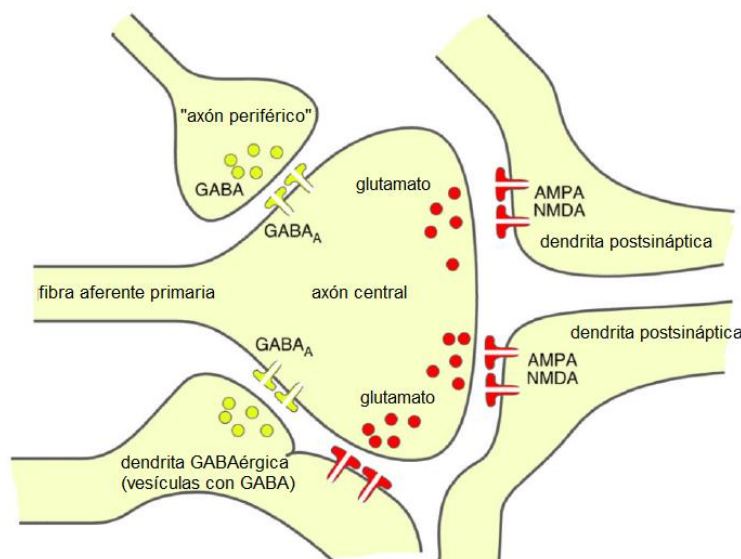


Figura 6. Glomérulo espinal de la inhibición pre-sináptica. El esquema muestra la formación del glomérulo sináptico alrededor del axón central de la fibra aferente primaria. Cada glomérulo se compone de cuatro elementos: dos dendritas post-sinápticas originadas de una neurona glutamatérgica, un axón terminal GABAérgico proveniente de la periferia (con el que forma una sinapsis axo-axónica) y una dendrita pre-sináptica que contiene vesículas con GABA. Modificado de Zeilhofer *et al.*, 2012a.

Las fibras aferentes primarias expresan dos proteínas responsables de la inhibición pre-sináptica: los receptores GABA_A y el co-transportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 1 (NKCC1) (Price *et al.*, 2006; Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009; Price *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2012). El NKCC1 transporta Cl⁻ al interior de las neuronas sensoriales primarias, lo cual mantiene la concentración intracelular de Cl⁻ por encima del potencial de equilibrio electroquímico. Por lo tanto, la apertura del receptor GABA_A por el GABA u otros agonistas permite la salida de Cl⁻ y produce una despolarización, conocida como despolarización de las neuronas aferentes primarias (PAD, *primary afferent depolarization*) (Rocha-González *et al.*, 2008; Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009). La PAD se genera en fibras aferentes que inervan músculo, mecano-receptores cutáneos, fibras C y Aδ (Álvarez-Leefmans, 1998), y se considera que es el mecanismo que subyace a la inhibición pre-sináptica (Willis, 1999). Esta despolarización reduce la transmisión nociceptiva a través de tres distintos mecanismos propuestos: 1) La PAD inactiva a los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) ubicados sobre los axones o las terminales de las aferentes primarias, interrumpiendo la propagación ortodrómica de los potenciales de acción provenientes de la periferia; 2) La PAD atenúa la amplitud de los potenciales de acción propagados (corto circuito) mediante un incremento en la conductancia de la membrana (*shunting*) producido por la apertura de canales de cloruro, lo que conlleva a una reducción en la liberación de neurotransmisores en la terminal central de las aferentes primarias; y 3) La PAD inactiva los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav) en las terminales centrales, reduciendo la entrada de calcio a la pre-sinapsis y por ende, disminuyendo la liberación de neurotransmisores (Rudomin y Schmidt, 1999; Price *et al.*, 2009; Zeilhofer *et al.*, 2012a).

Algunas condiciones como el daño al tejido nervioso o la inflamación persistente inducen el desarrollo de sensibilización periférica y central. Los estímulos que provienen de fibras no nociceptivas sensibilizadas estimulan de manera sostenida a las interneuronas GABAérgicas espinales. Por tanto, el GABA liberado de las interneuronas activa a los receptores GABA_A pre-sinápticos y extra-sinápticos de las neuronas sensibilizadas (que tienen una alta concentración intracelular de Cl⁻), permitiendo una salida masiva de Cl⁻. Esto genera una PAD excesiva, que sumada a la despolarización tónica producida por los receptores GABA_A extra-sinápticos, alcanza umbrales de disparo de potenciales de

acción ortodrómicos y antidrómicos en las aferentes primarias, conocidos como reflejos de la raíz dorsal (RRD) (Cervero *et al.*, 2003; Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009; Loeza-Alcocer *et al.*, 2013). De manera antidrómica, los RRD inducen la liberación de SP y CGRP desde las terminales periféricas de las aferentes primarias, lo que produce inflamación y contribuye al desarrollo de alodinia e hiperalgesia secundarias (García-Nicas *et al.*, 2001, 2006; Cervero *et al.*, 2003). Cuando se propagan de manera ortodrómica, los RRD sobreexcitan a las neuronas de segundo orden en la médula espinal (Cervero *et al.*, 2003) (**Figura 7**).

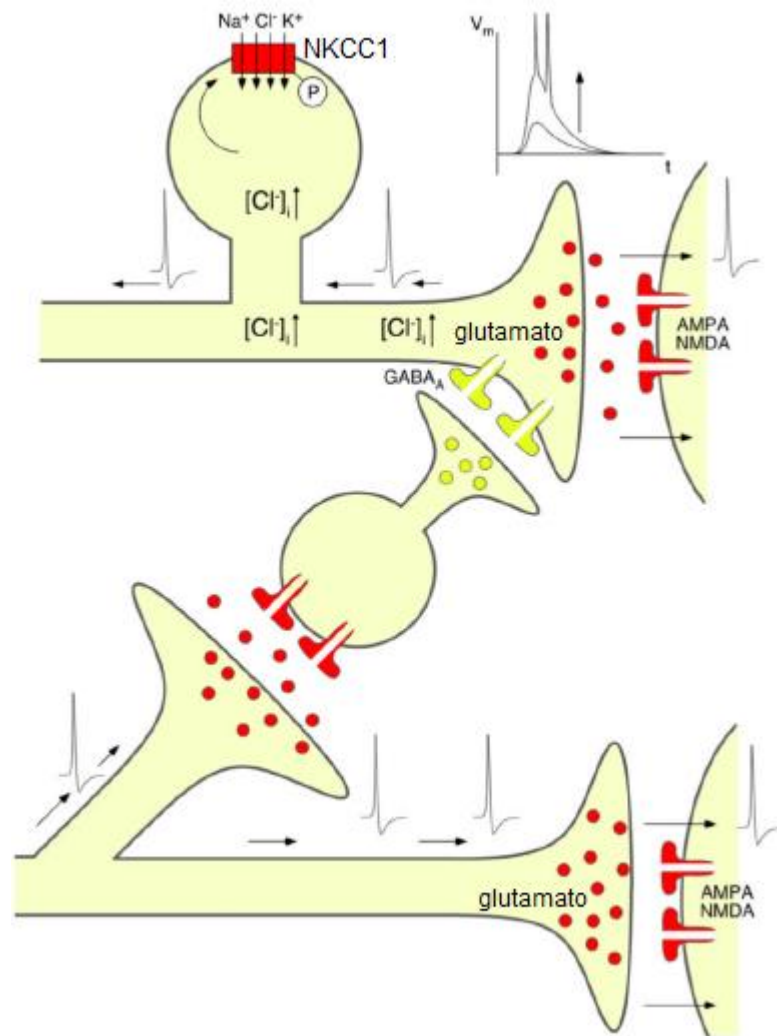


Figura 7. Reflejos de la raíz dorsal. Los RRD son una posible fuente de alodinia e hiperalgesia secundarias. La entrada sináptica desde axones no nociceptivos excita a una interneurona GABAérgica, la cual despolariza la terminal central del axón. Si la concentración intracelular de Cl^- de la terminal central es suficientemente alta y la estimulación GABAérgica suficientemente fuerte para alcanzar el umbral de activación, se generan potenciales de acción retrógrados que se conducen a la periferia provocando la liberación de péptidos pro-inflamatorios, mientras que sobreexcitan a las neuronas de proyección. Modificado de Zeilhofer *et al.*, 2012a.

Los RRD explican al menos en parte la hiperalgesia y alodinia observadas en ratas inyectadas con formalina (Granados-Soto *et al.*, 2005), capsaicina (García-Nicas *et al.*, 2001; Valencia de Ita *et al.*, 2006) e histamina (Willis y Coggeshall, 2004). Además, los RRD y la nocicepción se pueden bloquear por la administración intratecal de bumetanida, un inhibidor del NKCC1 y de antagonistas de los receptores GABA_A sinápticos (Valencia de Ita *et al.*, 2006) y extra-sinápticos (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013). Asimismo, en ratones *knockout* del NKCC1, la despolarización inducida por GABA_A se encuentra reducida (Sung *et al.*, 2000), y en la prueba del *tail-flick* tienen latencias de retiro mayores en comparación con los ratones silvestres (Laird *et al.*, 2004). La administración espinal de bumetanida, piretanida o furosemida reduce la nocicepción inducida por formalina (Granados-Soto *et al.*, 2005). Por lo tanto, el factor clave en la regulación de la amplitud de la PAD, inhibición pre-sináptica y RRD es la concentración intracelular de Cl⁻ en las neuronas aferentes primarias (Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009).

1.5.2 Inhibición y desinhibición post-sináptica

Las neuronas del SNC maduro y particularmente las neuronas secundarias de la lámina I de la medula espinal mantienen una concentración de Cl⁻ intracelular menor a la extracelular (Price y Prescott, 2015; Hammond y Drower, 1984), por lo que la activación del receptor GABA_A por el GABA permite el influjo de Cl⁻ a la neurona, lo que conduce a hiperpolarización (inhibición de la excitabilidad). La baja concentración de Cl⁻ en las neuronas de proyección se debe a la presencia del co-transportador K⁺-Cl⁻ 2 (KCC2) y la ausencia del NKCC1 (Price y Prescott, 2015; Price *et al.*, 2009).

Cuando el potencial de equilibrio del Cl⁻ es cercano al potencial de reposo de la membrana, la actividad de los receptores GABA_A o glicinérgicos producen un corto circuito o *shunting* que reduce la excitabilidad neuronal (Doyon *et al.*, 2011). En contraste, cuando el potencial de equilibrio del Cl⁻ es más positivo que el potencial de reposo de la membrana, la actividad de estos receptores puede volverse despolarizante. De hecho, un cambio de 5 mV en el potencial de equilibrio del Cl⁻ es suficiente para alterar las propiedades de disparo de las neuronas del GRD (Prescott *et al.*, 2006).

La inflamación crónica en la periferia también reduce la expresión de KCC2 a través del BDNF que se libera del tejido dañado (Kahle *et al.*, 2008). Además, la producción de mediadores inflamatorios también juega un papel importante en la desinhibición post-sináptica. Por ejemplo, la PGE₂ se une a sus receptores EP₂ post-sinápticos que están acoplados a PKA (Levine y Reichling, 1999), la cual fosforila al receptor de glicina y lo inhibe, impidiendo que este contribuya al control de la excitabilidad neuronal (Zeilhofer y Zeilhofer, 2008). Finalmente, la pérdida de inhibición permite la fosforilación de los receptores NMDA aumentando su actividad y el transporte de éstos a la membrana (Cao *et al.*, 2011).

En conjunto, la desinhibición resulta en un incremento de la transmisión nociceptiva y, por lo tanto, de la sensibilidad al dolor.

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Síndromes de dolor funcional

El dolor funcional (o dolor disfuncional, como también se halla en la literatura) es un tipo de dolor generalmente crónico que se presenta en ausencia de daño estructural o inflamación y que afecta seriamente la calidad de vida de quienes lo padecen (Henningesen *et al.*, 2007; Mayer y Bushnell, 2009; Nagakura, 2015). Los pacientes con síndromes de dolor funcional sufren hipersensibilidad o dolor inexplicable como síntoma principal, ya sea generalizado o localizado (Egloff *et al.*, 2014; Nagakura, 2015). Entre estos, destacan la fibromialgia, el síndrome de fatiga crónica, el síndrome del colon irritable, la disfunción temporomandibular crónica, la cefalea de tensión crónica, el síndrome de dolor pélvico y la cistitis intersticial, entre otros (Mayer y Bushnell, 2009; Egloff *et al.*, 2014).

Los síndromes de dolor funcional también se conocen como “síndromes de sensibilidad central” o “síndromes somáticos funcionales” (Yunus, 2007; Henningesen *et al.*, 2007). También se clasifican como “trastornos de dolor somático” por el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, Tercera y Cuarta Edición (DSM-III y IV, por sus siglas en inglés), ya que casi siempre ocurren en asociación con depresión, trastornos de ansiedad o estrés psicológico (Egloff *et al.*, 2014). Además, los síndromes de dolor funcional comparten otros síntomas como trastornos del sueño, problemas cognitivos, fatiga crónica y alteraciones en otros sistemas. De hecho, los pacientes que sufren un tipo de dolor funcional tienen una alta probabilidad de desarrollar algún otro y que se traslapen (Henningesen *et al.*, 2007; Nagakura, 2015), lo que sugiere que estos síndromes comparten una fisiopatología similar. Estudios de neuroimagen sugieren que ocurre una amplificación del dolor en el SNC (Gracely *et al.*, 2002; Nagakura, 2015), por lo que algunos mecanismos propuestos para explicar el dolor funcional incluyen la sensibilización central, la desinhibición y la facilitación descendente (Ossipov *et al.*, 2014). Muchos síndromes de dolor funcional se asocian con una reducción de la inhibición endógena del dolor y con la activación de nociceptores sensibilizados en combinación con sensibilización central (Staud, 2012). No obstante, se cree que pueden desencadenarse a partir de una interacción compleja entre susceptibilidad genética,

vulnerabilidad al dolor y diversos detonantes ambientales (von Baeyer y Champion, 2010; Crabtree y Ganty, 2016).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia mundial de los síndromes de dolor funcional es del 15-20% (Egloff *et al.*, 2014). Alrededor del 50% de los pacientes tiene síntomas de dolor crónico por más de 12 meses. La visita constante a los médicos en busca de alivio ocasiona una carga económica a nivel familiar-social y los pacientes se vuelven vulnerables al desempleo debido al ausentismo, la discapacidad y la pérdida de productividad (Nagakura, 2015; Crabtree y Ganty, 2016). La ausencia de un blanco terapéutico específico determina la importancia de investigar los mecanismos subyacentes del dolor funcional y eventualmente desarrollar tratamientos efectivos para los pacientes.

2.2 Fibromialgia

La fibromialgia es un síndrome de dolor músculo-esquelético generalizado que se caracteriza por una sensibilidad exagerada al tacto (hiperalgesia y alodinia) y varios síntomas concomitantes mediados por el SNC tales como fatiga, depresión, dificultades cognitivas y trastornos del sueño y del estado de ánimo (Clauw, 2014; Sluka y Clauw, 2016). La fibromialgia es una de las condiciones de dolor crónico más comunes, cuya prevalencia es del 2.7% de la población mundial y aumenta considerablemente cada año (Queiroz, 2013; Pasqual Marques *et al.*, 2017). Afecta más a las mujeres que a los hombres con una proporción 2:1, respectivamente, pero puede desarrollarse a cualquier edad, incluso en la niñez, y es independiente del grupo étnico (Clauw, 2014). En México se estima que alrededor del 5% de la población padece fibromialgia (Covarrubias-Gómez y Carrillo-Torres, 2016). El criterio de diagnóstico de la fibromialgia, publicado originalmente en 1990 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, *American College of Rheumatology*) era completamente clínico, requería que los pacientes presentaran dolor crónico generalizado y sensibilidad en al menos 11 de 18 “puntos sensibles” determinados (Wolfe *et al.*, 1990). El criterio se actualizó en 2010 y ahora los pacientes responden una encuesta que incluye un índice de dolor generalizado y una escala de severidad de síntomas (**Figura 9**), obteniendo un acercamiento alternativo al diagnóstico de la enfermedad (Wolfe *et al.*, 2011; Clauw, 2014).

Al igual que en otros síndromes de dolor funcional, se desconoce la etiología de la fibromialgia. El diagnóstico de la enfermedad suele ser difícil debido a la ausencia aparente de inflamación y de daño al tejido o a los nervios. Los mecanismos que se han propuesto para explicar los síntomas de la enfermedad incluyen: 1) Una desregulación del sistema nervioso (periférico, central y autónomo) que promueve la amplificación en la transmisión del dolor y en su interpretación a nivel cortical; 2) una disfunción neuroendocrina en respuesta al estrés mediado por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal; 3) una alteración en las funciones del sistema inmune; 4) una disfunción del metabolismo muscular producido por alteraciones del estrés oxidativo a nivel mitocondrial; y 5) factores genéticos (Sluka y Clauw, 2016; Covarrubias-Gómez y Carrillo-Torres, 2016).

Índice de Dolor Generalizado (1 punto por cada casilla; rango: 0-19 puntos)

① Por favor indique si ha tenido dolor o sensibilidad durante los últimos 7 días en las áreas mostradas a continuación.

Seleccione las casillas en el diagrama para cada área en la cual ha tenido dolor o sensibilidad.

Severidad de Síntomas (rango de puntuación: 0-12 puntos)

② Utilice la siguiente escala para indicar la severidad de cada síntoma durante los últimos 7 días.

- **Ningún problema**
- **Problema ligero o leve:** generalmente leve o intermitente
- **Problema moderado:** considerable; frecuente y/o a un nivel moderado
- **Problema severo:** continuo, afecta la calidad de vida

	Ningún problema	Problema leve	Problema moderado	Problema severo
Puntos	0	1	2	3
A. Fatiga	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B. Dificultad para pensar o recordar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C. Despertar cansado (sin energía)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

③ Durante los últimos 6 meses, ¿ha tenido alguno de los siguientes síntomas?

	0	1
A. Dolor o calambres en abdomen bajo	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí
B. Depresión	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí
C. Dolor de cabeza	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí

Criterios adicionales (sin puntuación)

④ Los síntomas (preguntas 2 y 3) y el dolor generalizado, ¿se han presentado a un nivel similar durante al menos 3 meses?

No Sí

⑤ ¿Tiene alguna enfermedad/trastorno que pueda explicar el origen del dolor?

No Sí

Figura 9. Criterio de la ACR para el diagnóstico de la fibromialgia. El rango de puntuación va de 0 a 31 puntos; un puntaje mayor o igual a 13 es consistente con un diagnóstico de fibromialgia. Modificado de Clauw, 2014.

La presencia de síntomas como fatiga, dificultades en la memoria, depresión, problemas para dormir y trastornos del estado de ánimo sustentan que el problema fundamental de la fibromialgia yace a nivel central (Clauw, 2014). La característica principal de los

pacientes con fibromialgia es la existencia de un desbalance en los niveles de neurotransmisores. Las concentraciones de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) están reducidas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en el suero de los pacientes fibromiálgicos (Russell *et al.*, 1992). Éstos también presentan un déficit en la actividad nociceptiva dependiente de opioides, con un incremento en los niveles de opioides en LCR y una disminución de la disponibilidad de receptores a nivel central (Baraniuk *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2007). Se cree que lo anterior puede desencadenar una alteración en la modulación descendente del dolor (Sluka y Clauw, 2016). Asimismo, se ha detectado un incremento de glutamato en LCR y en varias regiones cerebrales involucradas en el procesamiento del dolor, como la ínsula y la corteza cingular posterior (PCC) (Larson *et al.*, 2000; Sarchielli *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2009; Harris, 2010). Además, diversos estudios han demostrado que los pacientes con fibromialgia tienen una concentración de SP casi tres veces más alta que los controles sanos (Russell *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1999), sugiriendo que los neurotransmisores excitadores también pueden desempeñar un rol patogénico que contribuyen al fenómeno de *wind-up* y al mantenimiento de la sensibilización central (Sluka y Clauw, 2016).

La amplificación del procesamiento sensorial es un fenómeno fundamental en la fibromialgia y que puede ocurrir como consecuencia de las alteraciones en la modulación descendente. De hecho, diversos estudios de neuroimagen con resonancia magnética funcional (*fMRI*) han revelado que la activación irregular de la RVM se relaciona específicamente con el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización central (Lee *et al.*, 2008). En los pacientes con fibromialgia existe una disfunción de la inhibición del dolor a nivel cortical (Jensen *et al.*, 2009) y una disminución de la densidad de materia gris en la ACC, PCC y el giro parahipocampal bilateral (Wood *et al.*, 2009). Si bien los puntos sensibles representan regiones del cuerpo con una sensibilidad exagerada, lo cierto es que la hipersensibilidad es generalizada y difusa (Petzke *et al.*, 2001). Otros estudios de *fMRI* muestran patrones de activación cerebral que indican que los pacientes con fibromialgia experimentan dolor ante una presión ligera o un estímulo térmico leve, los cuales se perciben como inocuos por pacientes sanos (Gracely *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2004). Las regiones con mayor activación son la ínsula posterior, S1, S2, ACC, PCC, putamen, tálamo, amígdala e incluso cerebelo (Gracely *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2004;

López-Solà *et al.*, 2017). Además, los pacientes con fibromialgia tienen baja tolerancia al calor, al frío y a estímulos eléctricos mínimos, e incluso son más sensibles a otros estímulos sensoriales como el sonido (Petzke *et al.*, 2003; Geisser *et al.*, 2008).

La alteración de la estimulación nociceptiva en el sistema nervioso periférico también puede desempeñar un papel importante (Clauw *et al.*, 2011). Diversos estudios reportaron una reducción de fibras nerviosas de la epidermis en biopsias de pacientes con fibromialgia en comparación con controles sanos (Oaklander *et al.*, 2013; Uceyler *et al.*, 2013; Caro y Winter, 2014; Doppler *et al.*, 2015). Además, se determinó que las fibras C que no responden a estímulos mecánicos tienen un aumento de la actividad espontánea y se vuelven sensibles a estos estímulos (Serra *et al.*, 2014).

La inflamación sistémica crónica es otra posible causa de la fibromialgia. Diversos estudios demuestran un incremento en la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de las células del sistema inmune en pacientes con fibromialgia (Mendieta *et al.*, 2016). Entre estas citocinas destacan la IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Wallace *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008), las cuales también se incrementan a nivel periférico en alrededor del 30% de los pacientes (Salemi *et al.*, 2003). Otros factores que aumentan en la circulación o en LCR son la IL-8 (Wallace *et al.*, 2001; Kosek *et al.*, 2015), el ON (Larson *et al.*, 2000), la proteína HMGB1 (Oktayoglu *et al.*, 2013) y CX3CL1 (Bäckryd *et al.*, 2017). Todos estos mediadores inflamatorios conllevan a la activación y sensibilización de los nociceptores en la periferia y a nivel central (Costigan y Woolf, 2000; Basbaum *et al.*, 2009), lo que sugiere su participación en la generación del dolor crónico en la fibromialgia. Además de la hiperalgesia, el incremento en los niveles de IL-6 y TNF- α se ha relacionado con la modulación de síntomas concomitantes como fatiga y depresión (Wallace *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008).

Por su parte, la proteína HMGB1 es esencial en la respuesta al estrés oxidativo, ya que la unión a su receptor TLR4 modula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunos estudios sugieren que existe un desequilibrio entre la producción de ROS y los sistemas de defensa antioxidante en pacientes con fibromialgia, lo cual podría causar daños isquémicos en la periferia (Akkus *et al.*, 2009). Está reportado que los pacientes con fibromialgia presentan un severo daño oxidativo en el ADN del tejido muscular, que incluye la fragmentación del ADN, alteraciones en la expresión de enzimas

constitutivas y cambios en el número y el tamaño de las mitocondrias (Sprott *et al.*, 2004). Los niveles de vitaminas E y A en sangre se encuentran reducidos, mientras que se ha observado un aumento en la peroxidación de lípidos, lo cual es un indicativo de la degradación de los ácidos grasos de la membrana como consecuencia de la acción de las ROS (Akkus *et al.*, 2009). De la misma forma, varios estudios han sugerido que la concentración de coenzima Q₁₀, un antioxidante fundamental en la respiración mitocondrial, está disminuida en células sanguíneas de pacientes fibromiálgicos con respecto a los controles sanos (Cordero *et al.*, 2009; Cordero *et al.*, 2013). Además, la presencia de ROS activa al inflammasoma NLRP3, el cual promueve la producción de citocinas proinflamatorias y de ROS, creando un círculo vicioso de estrés oxidativo en las células (Cordero *et al.*, 2014). Finalmente, se ha observado vasoconstricción sobre el músculo (Lund *et al.*, 1986) y la piel (Jeschonneck *et al.*, 2000) localizados en los puntos sensibles, sugiriendo un estrés celular producido por hipoxia local en estas áreas.

La relación entre el estrés crónico y el desarrollo de fibromialgia ha establecido una línea de investigación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y del sistema nervioso simpático en la etiología de la enfermedad. Muchos pacientes con fibromialgia han sido previamente expuestos a estrés crónico, y a su vez, el estrés exagera el dolor en éste y otros síndromes de dolor crónico (Delvaux, 1999; Dai y Ma, 2014). El eje HPA en pacientes con fibromialgia muestra una respuesta reducida al cortisol, a la hormona del crecimiento y a la prolactina, y un incremento en la actividad de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) y de la hormona estimulante de folículo (Geenen *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2008). Los pacientes muestran una disminución en la cantidad de estrógenos, hormona del crecimiento y hormona triyodotironina (Neeck, 2000; Geenen *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2007), mientras que los niveles plasmáticos de cortisol suelen ser muy altos, sobre todo en la noche (Geenen *et al.*, 2002). Un subgrupo de pacientes también presenta niveles bajos y defectos funcionales del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1, Cuatrecasas *et al.*, 2012). Debido a que el sistema serotoninérgico influye significativamente en la función del eje HPA, algunas anormalidades del sistema endocrino pueden asociarse con la disminución de 5-HT característica de los pacientes con fibromialgia (Neeck, 2000). A su vez, las alteraciones en el eje HPA pueden estar relacionadas con la depresión del sistema nervioso autónomo. Está demostrado

que los pacientes tienen niveles plasmáticos reducidos de neuropéptido Y, un péptido que colocaliza con las neuronas noradrenérgicas del sistema nervioso simpático (Geenen *et al.*, 2002). Sin embargo, la interacción entre estos sistemas no ha sido dilucidada en la fibromialgia.

Debido a que la fibromialgia presenta agregación familiar (Arnold *et al.*, 2004), se ha evaluado la participación de factores y antecedentes genéticos en el desarrollo de la misma. Los genes candidato que se han propuesto como marcadores de la fibromialgia tienen relación con las alteraciones de la transmisión y el procesamiento del dolor. Entre éstos, destacan *COMT* (catecol-O-metiltransferasa), *ADRB2* (receptor adrenérgico β_2), *HTR2A* (receptor 5-HT_{2A}), *SLC6A4* (transportador de 5-HT dependiente de Na), *SERPINA1* (antitripsina- α_1), *CNR1* (receptor cannabinoide CB-1), *GRIA4* (subunidad 4 del receptor AMPA) y *GCH1* (ciclohidrolasa guanosin-trifosfato) (Ablin y Buskila, 2015). Además, un estudio reciente demostró que el ADN de los pacientes con fibromialgia tiene un patrón de hipometilación en genes implicados en la respuesta al estrés, en la reparación del ADN y en la eliminación de las ROS (Ciampi de Andrade *et al.*, 2017), sugiriendo que el desarrollo de la fibromialgia también puede estar relacionado con mecanismos epigenéticos.

En conjunto, todos estos antecedentes sugieren que la fibromialgia tiene múltiples mecanismos que subyacen una fisiopatología compleja. Por lo tanto, es necesario profundizar en el entendimiento de estos mecanismos para poder integrarlos y así desarrollar alternativas terapéuticas nuevas y eficientes.

2.2.1 Tratamiento de la fibromialgia

El objetivo principal en el manejo de la fibromialgia es reducir el dolor, pero también restaurar la salud emocional y mental para mejorar la calidad de vida. La respuesta al tratamiento farmacológico del dolor en la fibromialgia es similar al de los pacientes con dolor neuropático (Crofford, 2005). Entre los fármacos más utilizados se encuentran los antidepresivos tricíclicos, los gabapentinoides y los inhibidores de la recaptura de 5-HT y NA (**Tabla 1**). De éstos, sólo la pregabalina, la duloxetina y el minalcipran están aprobados por la FDA para el tratamiento de la fibromialgia (Clauw, 2014). Esta terapia

farmacológica está enfocada principalmente en incrementar la actividad de neurotransmisores como NA y 5-HT, y disminuir la concentración de neuromoduladores excitadores del SNC (está demostrado que la pregabalina disminuye la actividad glutamatérgica en la ínsula) (Harris *et al.*, 2013). A pesar de que los fármacos anteriormente mencionados disminuyen el dolor entre el 30-50%, éstos no suelen tener eficacia en todos los pacientes y producen efectos secundarios importantes que ocasionan el abandono del tratamiento.

Tabla 1. Tratamiento farmacológico de la fibromialgia.

Tipo	Fármacos	Dosis	Efectos adversos
Antidepresivos tricíclicos	Amitriptilina	10-70 mg/día	Boca seca, ganancia de peso, constipación, sensación de estar “drogado”
	Ciclobenzaprina	5-20 mg/día	
Inhibidores de la recaptura de 5-HT y NA	Duloxetina	30-120 mg/día	Náusea, palpitaciones, dolor de cabeza, fatiga, taquicardia, hipertensión
	Minalcipran	100-200 mg/día	
Gabapentinoides	Gabapentina	800-2400 mg/día	Sedación, ganancia de peso, mareo
	Pregabalina	+600 mg/día en dosis divididas	
γ-hidroxitbutirato*		4.5-6 mg por noche en dosis divididas	Sedación, depresión respiratoria
Inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT	Fluoxetina	20-40 mg/día	Náusea, disfunción sexual, ganancia de peso, problemas de sueño
	Sertralina	50 mg/día	
	Paroxetina	20-40 mg/día	
Cannabinoides**	Nabilona	0.5 mg antes de dormir o 1 mg dos veces al día	Sedación, mareo, boca seca
Opioides***	Naltrexona	4.5 mg/día	Sedación, adicción, tolerancia, hiperalgesia
	Tramadol	Con o sin acetaminofén, 50-100 mg/6 horas	

*Eficacia demostrada. No aprobado por la FDA debido a asuntos de seguridad. ** Ningún cannabinoide sintético ha sido aprobado para el tratamiento del dolor. ***Los opioides son poco efectivos para tratar el dolor crónico. No hay evidencia de eficacia en opioides más fuertes. Modificado de Clauw, 2014.

La administración de antagonistas del receptor NMDA como ketamina, dextrometorfano o memantina reduce el dolor, pero no son bien tolerados por los pacientes (Graven-Nielsen *et al.*, 2000). Por otro lado, la falta de efectividad de los opioides se debe posiblemente a la disfunción de la modulación descendente y las alteraciones en el sistema opioidérgico que presentan algunos pacientes (Harris *et al.*, 2007). El tramadol

es el único fármaco opioide con cierta eficacia en la disminución del dolor en la fibromialgia, pero es posible que este efecto se deba a su actividad como inhibidor de la recaptura de 5-HT y NA (Russell *et al.*, 2000). Asimismo, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y corticosteroides no disminuyen el dolor de los pacientes fibromiálgicos (Clauw, 2014). El acetaminofén se utiliza en combinación con el tramadol y aunque su eficacia *per se* no ha sido demostrada por completo, es efectivo en pacientes que padecen fibromialgia en combinación con osteoartritis o patologías similares (Bennett *et al.*, 2005). El uso de relajantes musculares como la ciclobenzaprina producen una mejoría generalizada, pero el 85% de los pacientes desarrollan efectos secundarios posteriormente (Tofferi *et al.*, 2004). Por su parte, el uso de cannabinoides como la nabilona disminuye el dolor y mejora el sueño, aunque es necesario realizar más estudios al respecto (Farré *et al.*, 2017). Finalmente, no existen estudios contundentes que demuestren la eficacia de las BZ en la fibromialgia, aunque generalmente se utilizan para tratar el insomnio y los trastornos de ansiedad (Corrigan *et al.*, 2012).

En la búsqueda de alivio de los síntomas de la fibromialgia se ha optado por tratamientos alternativos no farmacológicos. Entre éstos, destacan las terapias cognitivas-conductuales, la acupuntura y la hipnosis, las cuales han demostrado efectividad en la reducción del dolor, fatiga, insomnio y mejoran el humor y el manejo del estrés (Williams y Clauw, 2009). Los efectos benéficos del ejercicio aeróbico, la hidroterapia y el yoga involucran la activación de sistemas analgésicos endógenos y producen una sensación de bienestar general (Abeles *et al.*, 2008; Williams y Clauw, 2009). Diversos estudios demuestran que el uso de extractos y productos derivados de plantas medicinales reducen los síntomas de la fibromialgia, tales como la coenzima Q₁₀ y el extracto de *Ginkgo biloba* formulados en cápsulas (Lister, 2002) y las tabletas denominadas Meta050, que contienen sal de magnesio extraída del lúpulo, extracto de romero y ácido oleanólico (Lukaczer *et al.*, 2005). Por su parte, la aplicación tópica de capsaicina (McCarty *et al.*, 1994; Casanueva *et al.*, 2012) y de O24, un aceite compuesto de extractos de alcanfor, eucalipto, romero, aloe vera, menta, limón y naranja (Ko *et al.*, 2007; Rutledge y Jones, 2007), mejoran significativamente el dolor durante periodos cortos.

Además, algunos suplementos nutricionales como la coenzima Q₁₀ (Cordero *et al.*, 2012) y la L-carnitina (Rossini *et al.*, 2007) han mostrado efectos benéficos después de varias

semanas de consumo. Una dieta baja en glutamato también ha demostrado una mejora en los síntomas (Holton *et al.*, 2012).

En resumen, el manejo de la fibromialgia se basa en un tratamiento múltiple que busca mejorar la calidad de vida de quienes la padecen. Sin embargo, es necesario ahondar en los mecanismos de la enfermedad en búsqueda de nuevas y mejores alternativas terapéuticas.

2.3 Modelos de fibromialgia en animales

Los modelos son herramientas valiosas para desarrollar nuevos tratamientos e investigar los mecanismos que subyacen a las enfermedades (DeSantana *et al.*, 2013). En el caso de la fibromialgia, la búsqueda de un modelo en animales ha sido un reto debido a la etiología incierta, su condición de dolor generalizado sin lesión que se acompaña de múltiples síntomas concomitantes y la falta de biomarcadores (Sluka, 2009; Nagakura *et al.*, 2012). Los modelos que tienen el potencial de utilizarse para estudiar los mecanismos del dolor crónico generalizado y la fibromialgia se han clasificado en tres grupos (Nagakura *et al.*, 2012a; DeSantana *et al.*, 2013; Taguchi *et al.*, 2015): 1) Modelos de exposición a estresores; 2) Modelos que requieren la administración de un compuesto; 3) Modelos que combinan ambos aspectos. Todos estos modelos son similares en cuanto al desarrollo de hipersensibilidad generalizada y generan un daño mínimo en el tejido periférico. Sin embargo, los cambios en el sistema nervioso periférico y central y la respuesta al tratamiento farmacológico varían para cada uno (DeSantana *et al.*, 2011). La **Tabla 2** muestra un resumen de las características y hallazgos relevantes en los principales modelos de fibromialgia, a excepción del modelo de fibromialgia inducido por reserpina que se describe en la siguiente sección.

Tabla 2. Modelos de fibromialgia en roedores y sus hallazgos principales.

Modelo	Hallazgos importantes	
	Periféricos	Centrales
Insulto muscular repetido		
Solución salina ácida La hiperalgesia es producida por dos inyecciones de solución salina (pH 4) en el músculo gastrocnemio (Sluka <i>et al.</i> , 2001).	Ausencia de daño periférico (Sluka <i>et al.</i> , 2001).	Hiperalgesia mecánica generalizada y de larga duración; disminución de la actividad física voluntaria (Sluka <i>et al.</i> , 2001; Pratt <i>et al.</i> , 2013).
	La neurotrofina-3 revierte la hiperalgesia (Gandhi <i>et al.</i> , 2004).	La actividad de ERK aumenta en la amígdala, y también la transmisión postsináptica excitadora del núcleo parabraquial a la amígdala; esto depende de los canales de calcio tipo T (Chen <i>et al.</i> , 2010; Cheng <i>et al.</i> , 2011).
	Los ratones <i>knockout</i> de ASIC3 no desarrollan hiperalgesia (Sluka <i>et al.</i> , 2003).	Aumento en la liberación de glutamato y aspartato, y disminución de glicina en la RVM y médula espinal (Radhakrishnan y Sluka, 2009).
	La SP y su unión al receptor NK1 bloquean la activación de nociceptores musculares por ácido (Lin <i>et al.</i> , 2012).	La hiperalgesia mecánica se revierte con agonistas de los receptores mu y delta opioides, antagonistas de receptores glutamatérgicos, pregabalina, inhibidores de la recaptura, promotores de la apertura de los canales de K ⁺ , bloqueadores de los canales de Na ⁺ y la coadministración de tramadol con minalcipran. Los inhibidores de la COX-2 y las BZ no son efectivos (Sluka <i>et al.</i> , 2002; Skyba <i>et al.</i> , 2005; Kim <i>et al.</i> , 2009).
	La activación de ASIC3 en los nociceptores musculares incrementa la actividad de los Nav insensibles a tetrodotoxina (Chen <i>et al.</i> , 2014b).	Incremento en la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA en RVM; la regulación a la baja de esta subunidad previene la hiperalgesia (da Silva <i>et al.</i> , 2010).
	La hiperalgesia en la articulación se previene con un inhibidor de ASIC3 (Sugimura <i>et al.</i> , 2015).	Reducción del reflejo barorreceptor, cambios en el balance cardíaco mediados por el sistema autónomo (Oliveira <i>et al.</i> 2012).
		Conductas tipo ansiedad observadas en pruebas de campo abierto y laberinto elevado en cruz (Liu <i>et al.</i> , 2014).

Tabla 2. Modelos de fibromialgia en roedores y sus hallazgos principales (*continuación*).

<p>Priming hiperalгésico por inflamación aguda La hiperalgesia es causada por la inyección de carragenina, PGE₂ u otros mediadores en el músculo gastrocnemio o en la articulación de la rodilla (Radhakrishnan <i>et al.</i>, 2003; Dina <i>et al.</i>, 2008a).</p>	<p>Desarrollo de hiperalgesia muscular crónica (2 semanas) después de la inflamación aguda. La hiperalgesia depende de la activación de AMP cíclico y PKCε en nociceptores; la inhibición de la expresión de PKCε con oligodeoxinucléotidos antisentido reduce la hiperalgesia (Dina <i>et al.</i>, 2008a).</p> <p>La inhibición de la expresión de IL-6 previene la hiperalgesia inducida por PGE₂ (Dina <i>et al.</i>, 2008b).</p> <p>El pretratamiento con saporina-IB4 previene la hiperalgesia inducida por GDNF; el NGF produce hiperalgesia muscular; el priming depende exclusivamente de fibras no peptidérgicas (Joseph y Levine, 2010).</p> <p>La inhibición de la αCaMKIIp previene el efecto del <i>priming</i> inducido por PKCε (Ferrari <i>et al.</i>, 2013).</p>	
Estrés		
<p>Estrés intermitente en frío La hiperalgesia se induce por la exposición repetida a una temperatura de 4°C (Nishiyori y Ueda, 2008).</p>	<p>En cultivos de macrófagos, la respuesta inflamatoria al LPS incrementa después de la exposición al estrés (Montserrat-de la Paz <i>et al.</i>, 2015).</p> <p>Evidencia de alteraciones morfológicas del músculo gastrocnemio de ratones en ambos sexos (Bonaterra <i>et al.</i>, 2016).</p>	<p>Reducción de los niveles de serotonina y sus metabolitos en cerebro y médula espinal de ratas (Hata <i>et al.</i>, 1991).</p> <p>El bloqueo de los receptores NMDA, receptores de SP y receptores de CGRP reduce la hiperalgesia (Satoh <i>et al.</i>, 1992; Okano <i>et al.</i>, 1995).</p> <p>Disminución del efecto analгésico de la morfina (receptores mu) e incremento del efecto mediado por receptores kappa en médula espinal (Omiya <i>et al.</i>, 2000).</p> <p>La gabapentina y distintos antidepresivos reducen la hiperalgesia (Nishiyori y Ueda, 2008).</p> <p>Incremento de la concentración plasmática de corticosterona; ausencia de conductas tipo ansiedad y tipo depresivas (Nishiyori <i>et al.</i>, 2011).</p>

Tabla 2. Modelos de fibromialgia en roedores y sus hallazgos principales (*continuación*).

<p>Estrés por nado subcrónico La hiperalgesia se induce por la realización de la prueba de nado forzado en repetidas ocasiones (Quintero <i>et al.</i>, 2000).</p>		<p>Hiperalgesia térmica, disminución de la fuerza de agarre, incremento en la respuesta a irritantes (Quintero <i>et al.</i>, 2000, 2003).</p> <p>Incremento de c-Fos en la médula espinal en la prueba de formalina (Quintero <i>et al.</i>, 2003).</p> <p>La hiperalgesia se revierte con inhibidores de la recaptura de serotonina, triptófano y diazepam (Quintero <i>et al.</i>, 2000; Suárez-Roca <i>et al.</i>, 2006, 2008).</p> <p>Incremento en la expresión de los marcadores de actividad neuronal p-CREB y c-Fos en la corteza insular y ACC (Imbe <i>et al.</i>, 2014).</p> <p>Incremento de los niveles de PGE₂ que se previene con ketoprofeno o meloxicam, tratamiento que también reduce la hiperalgesia (Guevara <i>et al.</i>, 2015).</p>
<p>Estrés por sonido La hiperalgesia es causada por la exposición a sonidos de diversa amplitud, duración y tono en momentos impredecibles durante 4 días (Khasar <i>et al.</i>, 2009).</p>	<p>Incremento de los niveles plasmáticos de NA y aumento de la actividad de enzimas que sintetizan catecolaminas en la médula adrenal por más de 28 días (Khasar <i>et al.</i>, 2009).</p> <p>La hiperalgesia incrementa después de la administración local de PGE₂, NA o LPS (Khasar <i>et al.</i>, 2009; Dina <i>et al.</i>, 2011).</p> <p>La regulación a la baja de IL-6 disminuye la hiperalgesia (Dina <i>et al.</i>, 2011).</p>	<p>Hiperalgesia generalizada en vísceras, extremidades y músculo de la mandíbula; incremento de las conductas tipo ansiedad (Green <i>et al.</i>, 2011).</p>
<p>Estrés por inmersión en agua La hiperalgesia es causada por el alojamiento de los animales durante 5 días en cajas con agua a un nivel de 1.5 cm (Yasui <i>et al.</i>, 2014).</p>		<p>Activación de la microglía en médula espinal; la minociclina reduce la hiperalgesia (Yasui <i>et al.</i>, 2014).</p>

Tabla 2. Modelos de fibromialgia en roedores y sus hallazgos principales (*continuación*).

Factores combinados		
<p>Hiperalgnesia inducida por fatiga</p> <p>La hiperalgnesia es causada por la combinaci3n de ejercicio y la inyecci3n de soluci3n salina 1cida (Gregory <i>et al.</i>, 2013).</p>	<p>Ausencia de da1o muscular: no hay cambios en los niveles de lactato, pCO₂, creatinina cinasa o fosfato. Reducci3n de la fuerza muscular (Yokoyama <i>et al.</i>, 2007; Gregory <i>et al.</i>, 2013).</p> <p>El desarrollo de hiperalgnesia se previene con la administraci3n de un inhibidor de ASIC3 y de macr3fagos, pero no con la delec3n de ASIC3 en las aferentes primarias (Gregory <i>et al.</i>, 2016).</p>	<p>Hiperalgnesia muscular bilateral de larga duraci3n en ratones machos y hembras; las hembras presentan mayor sensibilidad, que se previene con la ovariectomía; esta 3ltima no afecta la duraci3n de las conductas nociceptivas (Sluka y Rasmussen, 2010; Gregory <i>et al.</i>, 2013).</p> <p>El bloqueo de los receptores NMDA de la RVM durante la inducci3n de fatiga previene el desarrollo de hiperalgnesia (Sluka <i>et al.</i>, 2012).</p> <p>Expresi3n de c-Fos en n3cleo magno de raf3; aumento de la fosforilaci3n de la subunidad NR1 del receptor NMDA en RVM (Sluka <i>et al.</i>, 2012, 2013; Gregory <i>et al.</i>, 2013).</p> <p>La actividad f3sica regular previene la hiperalgnesia y el incremento de NR1 fosforilada (Sluka <i>et al.</i>, 2013).</p>

2.3.1 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina en ratas

El modelo de fibromialgia inducido por reserpina fue introducido en 2009. La administraci3n de reserpina (1 mg/kg/3 d3as, s.c.) en ratas machos y hembras produce hiperalgnesia muscular y alodinia t1ctil generalizadas que persisten por 10-14 d3as (Nagakura *et al.*, 2009). Se cree que los efectos sobre la sensibilidad son consecuencia de la depleci3n de aminas biog3nicas en el SNC (Nagakura *et al.*, 2009; DeSantana *et al.*, 2013; Taguchi *et al.*, 2015). La concentraci3n de 5-HT, DA y NA disminuye en la m3dula espinal, t1lamo y corteza prefrontal en las ratas tratadas con reserpina, lo cual correlaciona con la reducci3n de los umbrales de alodinia t1ctil, hiperalgnesia muscular y est3mulo fr3o (Nagakura *et al.*, 2009, 2012b; Oe *et al.*, 2010). No obstante, las ratas reserpinizadas no presentan alteraciones en la presi3n arterial, en la temperatura, deficiencias motoras o cambios histopatol3gicos relevantes en el SNC (Oe *et al.*, 2010; Nagakura *et al.*, 2012b; Ogino *et al.*, 2013). De esta manera, el modelo mimetiza la hiperalgnesia observada en la fibromialgia sin producir da1o a los tejidos o inflamaci3n.

La hiperalgesia en este modelo disminuye con pregabalina, duloxetina, pramipexol, tramadol, amoxetina y agonistas del receptor 5HT_{2C}, pero no con diclofenaco u otros AINEs (Nagakura *et al.*, 2009; Ogino *et al.*, 2013; Kaneko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Una adaptación del modelo en ratones también demostró que la pregabalina y de manera novedosa la toxina Phx1 β , un bloqueador de los canales de calcio, reducen la hiperalgesia mecánica y térmica producida por reserpina, efecto que no se observó con el diclofenaco (de Souza *et al.*, 2014). En este sentido, el comportamiento de los fármacos en el modelo es similar al del tratamiento actual en pacientes (Clauw, 2014). Asimismo, en este modelo se observan patrones discriminatorios de activación cerebral en estudios de *fMRI* en ratas reserpinizadas con respecto al grupo control cuando se evalúa la respuesta a estímulos moderados (Wells *et al.*, 2017), los cuales son comparables con los patrones de respuesta en pacientes fibromiálgicos (López-Solà *et al.*, 2017).

Uno de los estudios más sobresalientes sobre la fisiopatología del modelo de fibromialgia inducido por reserpina corresponde al de Taguchi y colaboradores en 2015, donde se observó que la hiperalgesia en el modelo está regulada por mecanismos periféricos y centrales (**Figura 10**). Este grupo de investigación demostró la existencia de una alteración en la función de los nociceptores sensibles a estímulos mecánicos y una disminución de los mismos, sugiriendo una estimulación paradójica de la periferia que contribuye a la disfunción de la modulación nociceptiva. La reserpina aumenta la expresión de los canales ASIC3 en el GRD, pero no la expresión de otros receptores como los Piezo, TRPVs, canales de sodio dependientes de voltaje u otros ASIC. Además, el bloqueo de los canales ASIC3 reduce la hipersensibilidad mecánica. Asimismo, la reserpina induce la activación de la microglía en el asta dorsal de la médula espinal, mientras que el tratamiento intraperitoneal con minociclina, un inhibidor de la microglía, reduce y previene el desarrollo de hiperalgesia mecánica, sugiriendo que un estado de sensibilización central subyace la hipersensibilidad generada en el modelo junto con un fallo en la modulación descendente del dolor debida a la disminución de catecolaminas en el SNC (Taguchi *et al.*, 2015).

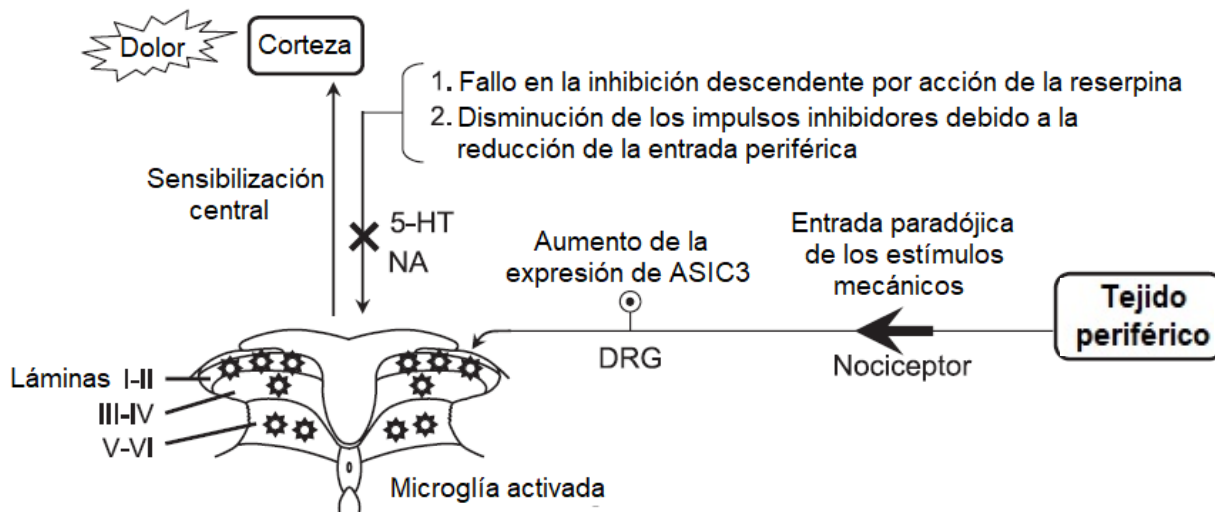


Figura 10. Mecanismos propuestos en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. En la periferia ocurren cambios paradójicos en la sensibilidad mecánica de las aferentes primarias, caracterizados por una disminución de la proporción de nociceptores que responden a estímulos mecánicos junto con un incremento de la magnitud de sus respuestas; esto resulta en la intensificación del dolor a nivel central, ocasionada por una reducción de la estimulación periférica. El ARNm de los canales ASIC3 se sobreexpresa en el DRG. En la médula espinal, se cree que ocurre una disfunción en la inhibición descendente debido a la depleción de 5-HT y NA. La microglía se activa en las láminas superficiales del asta dorsal. Modificado de Taguchi *et al.*, 2015.

Otros estudios han evaluado el incremento en los niveles de diversos mediadores y receptores. Está demostrado que los niveles de caspasa-3 y la expresión de la subunidad GluN2B de los receptores NMDA aumentan en la amígdala de ratones reserpinizados (Liu *et al.*, 2014). También se observó un incremento en los niveles de SP, ROS, citocinas pro-inflamatorias, NF- κ B y caspasa-3 (factores involucrados en el estrés oxidativo) en la corteza e hipocampo de ratas reserpinizadas (Arora y Chopra, 2013). Asimismo, los niveles de glutamato incrementan en el tálamo de ratones reserpinizados (Klein *et al.*, 2014), así como las ROS en el LCR (Klein *et al.*, 2016). De la misma forma, se observaron cambios en la estructura de las fibras del músculo gastrocnemio y una disminución en la expresión de enzimas antioxidantes aunada al incremento de ROS y citocinas pro-inflamatorias en ratas reserpinizadas. Esto es un indicativo de daño oxidativo muscular, mismo que se previene con la administración oral de melatonina (Favero *et al.*, 2017).

En el modelo de fibromialgia inducido por reserpina también se desarrollan conductas tipo depresivas, las cuales han sido validadas por un incremento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado (Nagakura *et al.*, 2009) y por una prueba de supresión del alimento (Blasco-Serra *et al.*, 2015). Está demostrado que la curcumina reduce las conductas tipo depresivas inducidas por reserpina en ratas (Arora *et al.*, 2011),

mientras que la toxina Ph α 1 β también reduce el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado (de Souza *et al.*, 2014). Por otro lado, también se han detectado conductas tipo ansiedad en este modelo en ratas mediante la evaluación en laberinto elevado en 0, una prueba derivada del laberinto elevado en cruz (Wu *et al.*, 2015).

La similitud de los síntomas y características del modelo de fibromialgia inducido por reserpina con la fisiopatología de la fibromialgia en humanos sustenta la elección de este modelo para la presente investigación.

2.4 Receptores GABA_A

Los receptores GABA_A son canales heteropentaméricos dependientes de ligando permeables al ion cloruro y bicarbonato (**Figura 11**). Pertenecen a la misma familia que los receptores nicotínicos de acetilcolina, los receptores 5-HT₃, los receptores glicinérgicos y los canales activados por zinc. La activación de los receptores GABA_A produce hiperpolarización de la membrana mediante el influjo de Cl⁻ en neuronas del SNC maduro, mientras que en la mayoría de las neuronas del SNC inmaduro y en las neuronas aferentes primarias (nociceptores) modulan respuestas despolarizantes que también son inhibitoras (Macdonald y Botzolakakis, 2009). En la actualidad se han clonado 19 subunidades, incluyendo α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π y ρ (1-3) (Olsen y Sieghart, 2008, 2009). La diversidad de las subunidades incrementa gracias al *splicing* alternativo que genera múltiples formas de las subunidades α 5, α 6, β 2, β 3 y γ 2 (D'Hulst *et al.*, 2001). La composición estequiométrica de los receptores GABA_A consta de dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ , esta última pudiendo ser reemplazada por cualquiera de las subunidades restantes. Las combinaciones α 1- β 2- γ 2 y α 2- β 3- γ 2 son las más comunes a nivel supraespinal, mientras que las subunidades α 1, α 2, α 3 y α 5 están expresadas en neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y glicinérgicas (Möhler *et al.*, 2002; Olsen y Sieghart, 2008).

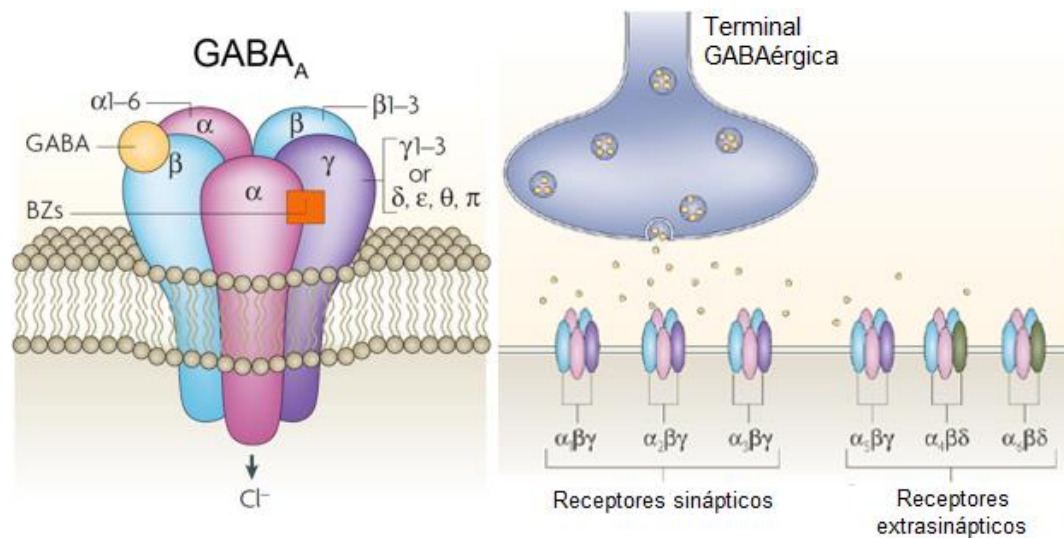


Figura 11. Receptores GABA_A sinápticos y extrasinápticos. Ensamble de subunidades para formar un canal heteropentamérico permeable al cloruro (izquierda). A pesar de la extensa heterogeneidad de las subunidades, la mayoría de los receptores GABA_A, expresados en el SNC consisten en 2α, 2β y 1γ, esta última pudiendo ser reemplazada por cualquiera de las otras subunidades (δ, ε, θ, π y ρ). GABA se une en la interface entre las subunidades α y β, permitiendo la apertura del canal. El sitio de unión de BZ se encuentra en la interface entre las subunidades α(1, 2, 3 o 5) y γ, potenciando el flujo de Cl⁻ inducido por GABA. Los receptores GABA_A sensibles a BZ se componen de la subunidad α(1-3), β y γ son principalmente sinápticos, mientras que los receptores α₅βγ se distribuyen ampliamente en sitios extrasinápticos (derecha). En contraste, los receptores α(4,6)βδ son insensibles a BZ y se localizan en sitios extrasinápticos. Modificado de Jacob *et al.*, 2008.

Las propiedades farmacológicas de los receptores GABA_A están determinadas por la composición y arreglo de sus subunidades, lo cual también les otorga propiedades particulares en su cinética y localización (Macdonald y Botzolakis, 2009; Delgado-Lezama *et al.*, 2013). La interface entre las subunidades α y γ forman el sitio de unión a las benzodiazepinas (BZ) (Rudolph y Knoflach, 2011), y solo los receptores que contengan la subunidad α₁, α₂, α₃ o α₅ son sensibles a BZ (Möhler *et al.*, 2002). Los receptores GABA_A son modulados por BZ, barbituratos, esteroides, anestésicos y convulsivantes, entre otros (D'Hulst *et al.*, 2001) (**Tabla 3**). La mayoría de estos fármacos actúan como moduladores alostéricos positivos (PAMs) o negativos (NAMs, también llamados agonistas inversos), ya que no interactúan directamente con el sitio de unión a GABA sino que se unen a sitios alostéricos y regulan la actividad del receptor, modificando su cinética y la eficacia/afinidad de los agonistas. Por ejemplo, las benzodiazepinas modifican la configuración del receptor GABA_A, lo que incrementa su afinidad por el GABA y la frecuencia de apertura del canal (Rudolph y Knoflach, 2011).

Tabla 3. Farmacología de los receptores GABA_A.

		Benzodiazepinas	TPBS/Picrotoxina	Esteroides
Subunidad involucrada	α y β	$\alpha 1,2,3,5$; β , y $\gamma 2$	Poros del canal	$\alpha 4,6$; β , y δ
Agonista endógeno	GABA			Metabolitos de la progesterona
Agonistas	Muscimol	-Diazepam -Flunitrazepam -Clonazepam -Bromazepam -Lorazepam		-3 α 5 α -THDOC -3 α -OH-5 α -pregnan-20-ona -5 α -androstan-3 α ,17 α -diol
Antagonistas	-Bicuculina -Gabazina	-B-CCE -Flumazenil	-TPBS -Picrotoxina	Sulfato de pregnenolona
Agonista inverso		DMCM		
Agonistas parciales	-Imidazol-4-ácido acético -Piperidina-4-ácido sulfónico -4-PIOL -THIP (gaboxadol), selectivo de subunidad δ	-Bretazenil -TPA-023 ($\alpha 2$, $\alpha 3$) -L-838,417 ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$) -Zolpidem ($\alpha 1$) -NS11394 ($\alpha 2$, $\alpha 3$)		
Agonistas inversos (parciales)		-FG-7142 - $\alpha 5$ IA ($\alpha 5$) -L-655,708 ($\alpha 5$) - $\alpha 3$ IA ($\alpha 3$) -RO4938581 ($\alpha 5$) -RO154513 ($\alpha 5$, débil)		

Los agonistas mimetizan los efectos inhibitorios del GABA, los antagonistas compiten por el sitio de unión de los agonistas pero no tienen efecto y los agonistas inversos revierten la acción del GABA. Modificado de D'Hulst *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011.

Los receptores GABA_A se clasifican por su localización en sinápticos y extra-sinápticos, los cuales presentan diferencias en sus propiedades biofísicas y farmacológicas (**Figura 11**). Los receptores GABA_A sinápticos regulan las corrientes fásicas o rápidas aumentando la permeabilidad al Cl⁻ por periodos de tiempo breves (<100 ms), ya que se activan por el GABA que se libera de las interneuronas GABAérgicas. Por lo tanto, estos receptores producen corrientes post-sinápticas inhibitorias en neuronas del SNC maduro, despolarización post-sináptica excitadora en neuronas del SNC inmaduro y PAD en las neuronas nociceptivas (Farrant y Nusser, 2005; Delgado-Lezama *et al.*, 2013). Los receptores GABA_A extra-sinápticos se localizan en las membranas somáticas, dendríticas y axónicas, pero no sobre las terminales. Los receptores extra-sinápticos tienen una mayor afinidad por el GABA (son sensibles al GABA ambiental) y su activación genera

un aumento persistente de la conductancia del Cl⁻, es decir, modulan la excitabilidad neuronal a través de una inhibición tónica (Farrant y Nusser, 2005; Walker y Semyanov, 2008; Loeza-Alcocer *et al.*, 2013). Las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$ en combinación con la subunidad $\gamma 2$ predominan en los receptores GABA_A extra-sinápticos, mientras que los receptores que expresan la subunidad δ son exclusivamente extra-sinápticos (Farrant y Nusser, 2005). El bloqueo de la inhibición mediada por los receptores GABA_A, ya sea fásica o tónica, tiene implicaciones en la transmisión nociceptiva.

2.4.1 Receptores GABA_A y dolor

Cuando el GABA se une a los receptores ionotrópicos GABA_A el Cl⁻ se desplaza al interior de la neurona, produciendo hiperpolarización y debilitando la propagación dendrítica de las señales excitadoras que transmiten el dolor (Zeilhofer *et al.*, 2009; Price y Prescott, 2015). Los receptores GABA_A se expresan en terminales periféricas de fibras no mielinizadas (Carlton *et al.*, 1999), en los GRD y a lo largo de las aferentes primarias (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013). Las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ se localizan en las terminales centrales de fibras A β , fibras A δ y fibras C peptidérgicas y no peptidérgicas (Paul *et al.*, 2012; Lorenzo *et al.*, 2014).

El papel farmacológico de los receptores GABA_A es controvertido. El bloqueo de los receptores GABA_A con antagonistas produce alodinia mecánica y dolor espontáneo (Price y Prescott, 2015), mientras que la administración de agonistas como GABA o muscimol produce antinocicepción en ratas (Hammond y Drower, 1984). Esto sugiere que la activación de los receptores GABA_A produce antinocicepción. Está demostrado que la inyección i.t. de bicuculina genera hiperexcitabilidad neuronal y alodinia en ratones *naïve* (Lee y Lim, 2010). La administración de GABA y muscimol reduce la nocicepción inducida por formalina y en ratas con dolor incisional, efectos que se bloquean con bicuculina (Dirig y Yaksh, 1995; Reichl *et al.*, 2012). Por otro lado, existe evidencia de que la activación de los receptores GABA_A también puede producir dolor. Por ejemplo, la administración periférica e intratecal de muscimol exagera la hipersensibilidad en los modelos inflamatorios de formalina y CFA, respectivamente (Carlton *et al.*, 1999; Anseloni y Gold, 2008). De hecho, los receptores GABA_A aumentan su densidad de corriente mediante su

fosforilación por tirosina cinasa en condiciones de inflamación (Zhu *et al.*, 2012). En el caso del dolor neuropático, la lesión parcial del nervio ciático reduce la inhibición mediada por los receptores GABA_A pero incrementa la expresión de éstos (Moore *et al.*, 2002). Diversos estudios han demostrado la participación específica de las subunidades del receptor GABA_A en la modulación del dolor, aunque también presentan resultados paradójicos. Las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ son responsables del efecto antihiperálgico del diazepam en ratones *knockout* (Knabl *et al.*, 2008), mientras que el tratamiento con un agonista parcial de las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ reduce la hiperálgia en el dolor neuropático e inflamatorio (Di Lio *et al.*, 2011). La subunidad $\alpha 2$ expresada en las fibras aferentes primarias facilita la activación de los receptores GABA_A presinápticos y modulan la PAD (Witschi *et al.*, 2011). La activación de la subunidad δ incrementa la inhibición tónica y atenúa la hiperálgia inducida en la fase II de la prueba de formalina (Bonin *et al.*, 2011). La administración sistémica de PAMs de las subunidades $\alpha 5$, -3 y -2 reducen la nocicepción en distintos modelos de dolor neuropático e inflamatorio en roedores (Munro *et al.*, 2008; Nickolls *et al.*, 2011), pero los NAMs también atenúan y revierten el dolor (Munro *et al.*, 2011). Esta controversia podría explicarse por un cambio en la función de los receptores GABA_A en condiciones de dolor patológico. Finalmente, la selectividad de los PAMs y NAMs utilizados en estos estudios sugieren la participación de la subunidad $\alpha 5$ en la nocicepción.

2.5 Receptores GABA_A- $\alpha 5$

La subunidad $\alpha 5$ está ensamblada principalmente a las subunidades β y γ , y tiene una localización predominantemente extra-sináptica en el SNC maduro (Rudolph y Möhler, 2014), donde se expresan al menos dos variantes que difieren en su contenido de carbohidratos (Sieghart *et al.*, 1993). En humanos, algunos estudios de neuroimagen sugieren que los receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ (GABA_A- $\alpha 5$) se expresan en hipocampo, corteza y estriado ventral (Mendez *et al.*, 2013). En roedores, la subunidad $\alpha 5$ se expresa en la corteza, amígdala, bulbo olfatorio, médula espinal y especialmente en el hipocampo (Sur *et al.*, 1999; Rudolph y Möhler, 2014). En las neuronas de la región CA1 de hipocampo, los receptores GABA_A- $\alpha 5$ modulan la inhibición

tónica, contribuyen ocasionalmente en eventos de inhibición fásica lenta (Zarnowska *et al.*, 2009) y son capaces de alterar las oscilaciones neurales, lo cual tiene un impacto en procesos cognitivos (Bonin *et al.*, 2007; Rudolph y Möhler, 2014). Los ratones que carecen de la subunidad $\alpha 5$ muestran mejores resultados en varias pruebas cognitivas, aunque presentan alteraciones en las funciones ejecutivas y en la memoria a corto plazo (Martin *et al.*, 2009; Atack, 2011; Zurek *et al.*, 2016), mientras que la administración de agonistas inversos selectivos de esta subunidad también mejora la memoria y el aprendizaje (Collinson *et al.*, 2002; Millić *et al.*, 2013).

La expresión hipocampal de los receptores GABA_A- $\alpha 5$ es dinámica, pues se altera en presencia de citocinas proinflamatorias (Wang *et al.*, 2012) y en modelos murinos de Alzheimer (Wu *et al.*, 2014). La subunidad $\alpha 5$ regula las conductas de recompensa, el deterioro motor y los efectos sedantes del alcohol (McKay *et al.*, 2004). Por otra parte, la activación crónica de los receptores GABA_A- $\alpha 5$ participa en el desarrollo de tolerancia al diazepam (van Rijnsoever *et al.*, 2004) y está vinculada a trastornos del espectro autista (Mendez *et al.*, 2013; Zurek *et al.*, 2016) y con el síndrome de Down (Braudeau *et al.*, 2011; Rudolph y Möhler, 2014). Finalmente, la participación de los receptores GABA_A- $\alpha 5$ en la inhibición tónica de la transmisión del dolor es controvertida.

2.5.1 Receptores GABA_A- $\alpha 5$ y dolor

Los receptores GABA_A- $\alpha 5$ están expresados en sitios relacionados con la nocicepción. La subunidad $\alpha 5$ se encuentra en la médula espinal en motoneuronas, interneuronas del asta ventral (Castro *et al.*, 2011), estratos superficiales del asta dorsal, en neuronas del GRD y en las terminales de fibras aferentes primarias peptidérgicas y no peptidérgicas (Bohlhalter *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2012; Loeza-Alcocer *et al.*, 2013; Lorenzo *et al.*, 2014). Los receptores GABA_A con la configuración $\alpha 5\beta\gamma 2$ modulan la inhibición tónica en la médula espinal (Takahashi *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2007), y esta inhibición es abolida en las interneuronas por la administración de L-655,708, un agonista inverso selectivo de la subunidad $\alpha 5$ (Castro *et al.*, 2011). Está demostrado que la inhibición de los receptores GABA_A- $\alpha 5$ potencia la transmisión glutamatérgica (Martin *et al.*, 2009) Asimismo, la aplicación de L-655,708 en rebanadas de médula espinal deprime los RRD sin afectar la

corriente fásica de la PAD (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013), sugiriendo que los receptores GABA_A-α5 peri o extrasinápticos modulan la transmisión nociceptiva y la excitabilidad neuronal. Sin embargo, el papel de los receptores GABA_A-α5 en condiciones de dolor ha sido motivo de discusión. Diversos estudios realizados en modelos de dolor inflamatorio y neuropático con PAMs selectivos de la subunidad α5 sugieren que la activación de los receptores GABA_A-α5 tiene un efecto antinociceptivo (Munro *et al.*, 2008, 2011; Hansen *et al.*, 2012). El tratamiento con dos distintos PAMs selectivos para las subunidades α5>α3>α2 (NS11394 y NS16085) en rebanadas de médula espinal sugiere que el efecto analgésico se debe a las subunidades α2 y α3, pero no a la subunidad α5, ya que la eficacia de ambos fármacos sobre esta última fue completamente distinta (NS11394 con 78% *versus* NS16085 con 5%) (García de Lucas *et al.*, 2015). No obstante, el mismo grupo de investigación reportó que los NAMs selectivos de la subunidad α5 también reducen la nocicepción en modelos de dolor inflamatorio y neuropático, sugiriendo que la activación de estos receptores también promueve el dolor (Munro *et al.*, 2011). Esto último concuerda con estudios previos realizados en el laboratorio, donde se demostró que el bloqueo del receptor GABA_A-α5 mediante la administración de L-655,708 previno el efecto pronociceptivo producido por el tratamiento con agonistas del receptor GABA_A en el modelo de formalina en ratas (Bravo-Hernández *et al.*, 2014). De la misma forma, la administración local e intratecal de L-655,708 previene y revierte la hipersensibilidad inducida en el modelo de formalina de larga duración, en el modelo de CFA y en un modelo de dolor neuropático (ligadura de nervios espinales), sugiriendo la participación de los receptores GABA_A-α5 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia e hiperalgesia en estos modelos (Bravo-Hernández *et al.*, 2016). Además, se observó un incremento significativo de la expresión del ARNm del receptor GABA_A-α5 en médula espinal y ganglios de la raíz dorsal en ratas en el modelo de formalina de larga duración (Bravo-Hernández *et al.*, 2016), en el modelo de axotomía del nervio ciático (Xiao *et al.*, 2002; Yang *et al.* 2004) y en neuronas parvocelulares del hipotálamo en un modelo de estrés crónico impredecible en ratas (Verkuyl *et al.*, 2004). A la fecha no se conoce la participación de los receptores GABA_A-α5 en modelos de dolor funcional, particularmente en el modelo de fibromialgia inducido con reserpina.

3. JUSTIFICACIÓN

La fibromialgia afecta gravemente la calidad de vida de quienes la padecen. Las causas de la enfermedad no están bien definidas, por lo que su tratamiento es poco efectivo. Se ha observado que en condiciones de dolor crónico los sistemas de inhibición espinal están alterados, reduciendo su capacidad de inhibir el dolor e incluso llegando a producir excitación. Los receptores GABA_A participan en este fenómeno. Particularmente los receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ juegan un papel importante en la modulación de conductas nociceptivas en modelos crónicos de dolor inflamatorio y neuropático. Sin embargo, se desconoce si estos receptores están involucrados en el mantenimiento de la alodinia e hiperalgesia muscular en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. La demostración de la participación de los receptores GABA_A- $\alpha 5$ podría representar una alternativa terapéutica para el tratamiento de la fibromialgia y otros síndromes de dolor funcional relacionados.

4. HIPÓTESIS

Los receptores GABA_A-α5 contribuyen a la hipersensibilidad nociceptiva (alodinia táctil e hiperalgia muscular) en un modelo de fibromialgia en la rata.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el papel de los receptores GABA_A-α5 en la alodinia táctil e hiperalgia muscular en el modelo de fibromialgia en ratas.

5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar el modelo de fibromialgia inducida por la administración subcutánea de reserpina en ratas.
- Evaluar farmacológicamente la contribución de los receptores GABA_A-α5 en la alodinia táctil e hiperalgia muscular que se generan en el modelo de fibromialgia en ratas.
- Determinar la expresión de los receptores GABA_A-α5 en el ganglio de la raíz dorsal y médula espinal en el modelo de fibromialgia en ratas.
- Evaluar la contribución de la microglía y los astrocitos mediante inmunohistoquímica en el modelo de fibromialgia.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembras y machos con un peso corporal de 220-260 g. Estas ratas se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con libre acceso a agua y alimento. En ningún caso se determinó la fase del ciclo estral de las ratas hembra. Los animales se habituaron a la manipulación y a los equipos y técnicas de evaluación durante al menos 3 días consecutivos antes de cada procedimiento. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). El presente trabajo está sustentado por el Protocolo 0042-13, aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Cinvestav.

6.2 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina

El dolor se indujo de acuerdo al procedimiento descrito por Nagakura y colaboradores (2009). La reserpina (Cat. R0875, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se disolvió en ácido acético glacial (Cat. 320099, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se diluyó a una concentración final de 0.5% de ácido acético en solución salina al 0.9%. Posteriormente se administró vía subcutánea 1 mg/kg una vez al día durante tres días consecutivos.

6.3 Evaluación de conductas nociceptivas

6.3.1 Determinación de la alodinia táctil

Las ratas se colocaron de forma individual en cajas de acrílico transparente sobre una malla metálica durante 30 min para habituarse. Los animales se estimularon en la parte media de la pata con los filamentos de von Frey (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). El 50% de umbral de retiro se determinó empleando el método “*up-down*” (Chaplan *et al.*, 1994; Dixon, 1980). Se inició con el filamento de 2 g y se ascendió o descendió con incrementos logarítmicos de rigidez (1.65-6.65 g) en función de la respuesta del animal. Una respuesta positiva provoca el retiro de la pata estimulada en un lapso de 5-8 segundos, mientras que una respuesta negativa es aquella donde el estímulo no genera

el retiro de la pata en el mismo lapso de tiempo. Después de la primera respuesta positiva, la pata se estimuló otras cuatro veces tomando en total una serie de seis patrones de respuestas positivas y negativas. El 50% del umbral de respuesta se calculó con la siguiente fórmula:

$$50\% \text{ umbral (g)} = \left(10^{[X_f + k\delta]}\right) / 10000$$

Donde X_f es el valor del último filamento de von Frey utilizado (en unidades logarítmicas); k es el factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado con base al número de respuestas positivas y negativas; y δ se refiere a las diferencias de promedio entre estímulos (unidades logarítmicas).

6.3.2 Evaluación del umbral de presión muscular

El umbral de presión muscular se midió de acuerdo al método reportado por Schäfers y colaboradores (2003). Las ratas se envolvieron en un paño de franela y cada extremidad posterior se posicionó para aplicar una fuerza mecánica que incrementa linealmente (máximo 250 g) sobre el músculo gastrocnemio. La respuesta se midió como la presión en gramos necesaria para que la rata retire la extremidad o vocalice. Cada prueba se repitió tres veces con intervalos de al menos un minuto entre cada estímulo. El promedio de umbral de presión muscular se calculó con base en las tres mediciones.

6.4 Fármacos

El L-655,708 (etil (S)-11,12,13,13a-tetrahidro-7-metoxi-9-oxo-9Himidazo[1,5a] pirrolo [2,1-c] [1,4]benzodiazepin-1-carboxilato) (Cat. L9787, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y TB21007 (6,7-dihidro-3-[(2-hidroxietil)tio] 6,6-dimetil-1-(2-tiazolil)-benzo[c]tiofen-4(5H)-ona) (Cat. 2905, Tocris Bioscience, Ellisville, MO), agonistas inversos selectivos para la subunidad α_5 del receptor GABA_A (**Tabla 4**), se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO, Cat. D8418, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 30% para administración intratecal en un volumen de 10 μ l en tres dosis distintas (0.15, 5 y 15 nmol; 1.5, 15 y 150 nmol, respectivamente). El L-838,417 (3(2-5-difluorofenil)-7-(1,1-dimetiletil)-6-([1-metil-1H-

1,2,4-triazol-5-il) metoxi]-1,2,4-triazolo [4,3-b]piradazina) (Cat. 3250, Tocris Bioscience, Ellisville, MO), agonista parcial de las subunidades α_2 , α_3 y α_5 del receptor GABA_A y la (+)-bicuculina (Cat. B-9130, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), antagonista competitivo de los receptores GABA_A, también se disolvieron en DMSO al 30% para administración intratecal en una dosis de 15 nmol y 0.8 nmol, respectivamente.

La elección de las dosis de L-655,708 y L-838,417 se basó en estudios previos (Bravo-Hernández *et al.*, 2016), al igual que la dosis de bicuculina (John *et al.*, 1998; Malan *et al.*, 2002; García-Nicas *et al.*, 2006). La elección de las dosis de TB21007 se basó en experimentos piloto realizados en el laboratorio.

De acuerdo a los resultados de la caracterización del modelo, la evaluación farmacológica en los grupos se llevó a cabo el día 7 posterior a la última inyección de reserpina.

Tabla 4. Afinidad de los fármacos utilizados en este trabajo.

Fármaco	Función	Receptor	pKi	Afinidad por otros
L-655,708	Agonista inverso	GABA _A - α_5	9.3	$\alpha_3 > \alpha_2 > \alpha_1 > \alpha_6$ (pKi 7.6 – 7.0)
TB21007	Agonista inverso	GABA _A - α_5	8.8	$\alpha_2 > \alpha_1 > \alpha_3$ (pKi 7.8 – 7.7)
L-838,417	Agonista parcial	GABA _A - α_5	8.6	$\alpha_1 > \alpha_2 \geq \alpha_3$ (pKi 9.17 – 9.1)
Bicuculina	Antagonista	GABA _A	5.7	$\alpha_2 > \alpha_3 > \alpha_5 = \alpha_1$ (pKi 5.73 – 5.35)

Quirk *et al.*, 1996; Ebert *et al.*, 1997; Chambers *et al.*, 2003; McCabe *et al.*, 2004.

6.5 Knockdown de los receptores GABA_A- α_5

Se realizó un tratamiento vía intratecal con ARN de interferencia (siRNAs) dirigidos a los receptores GABA_A- α_5 . El esquema de administración se basó en el protocolo publicado por Njoo y colaboradores (2014), con algunas modificaciones. La preparación de los siRNAs se llevó a cabo inmediatamente antes de cada administración como indican las recomendaciones del fabricante (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). El siRNA de GABA_A- α_5 (Cat. sc-270130) y el siRNA control (Cat. sc-36869) se reconstituyeron cada uno con 330 μ l de solución amortiguadora libre de RNAsas (Cat.

sc-29527, pH 8). Posteriormente, se mezclaron en tubos Eppendorf pequeños (correspondientes a las dosis individuales de cada grupo de ratas) 8 µl de siRNA y 4 µl de reactivo de transfección (Cat. sc-29528), se agitaron suavemente, se incubaron durante 40 min a temperatura ambiente y se administraron vía intratecal en un volumen de 12 µl, correspondiente a 1 µg de siRNA. El procedimiento se repitió hasta completar un esquema de administración de 1 µg de siRNA cada 24 h durante tres días consecutivos.

6.6 Determinación de la expresión de los receptores GABA_A-α5

6.6.1 Extracción de tejido

Las ratas se sacrificaron por decapitación, la médula espinal se extrajo por hidro-extrusión y el segmento lumbar se dividió sagitalmente para separar y obtener la porción dorsal (L1-S1), retirando todo el tejido circundante. Además, se localizaron y extrajeron los ganglios de la raíz dorsal (L4-L6). Todas las muestras se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron en tubos de centrifugación a -70°C hasta su uso.

6.6.2 Western blot

Las muestras se homogeneizaron con 400 µl de buffer RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón 100x 0.1%, SDS 1%) que contenía una serie de inhibidores de proteasas (aprotinina 6.8 µg/ml, leupeptina 4 µg/ml, pepstatina A 4 µg/ml, SBTI 4 µg/ml, PMSF 2 mM y NaVO₄ 2 mM) a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,200 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta la cuantificación de proteínas totales.

La concentración de proteínas totales del sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron volúmenes equivalentes a 75 µg de proteína total y se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida de dos dimensiones al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Éstas se bloquearon a 4°C durante toda la noche con leche descremada al 5% en buffer de fosfatos en solución salina (PBS) a pH 7.4 (137 mM NaCl,

2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PO₄) con Tween 0.05%. Posteriormente, se incubaron durante 24 h a 4°C con un anticuerpo primario dirigido contra los receptores GABA_A-α5 (goat anti-GABA_A-α5, dilución 1:500; Cat. SC-31417, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). Para la inmunodetección del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (donkey anti-goat HRP conjugated, dilución 1:3000; Cat. SC-2020, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). Finalmente, se detectaron las señales de los inmunoblots mediante un sistema de quimioluminiscencia para obtener una imagen fotográfica (ChemiDoc™ XRS+ ImagingSystem, Bio-Rad, CA, EUA) y se realizó el análisis densitométrico de las bandas (ImageLab™ versión 5.0, Bio-Rad, CA). Después de la detección, las membranas nuevamente se bloquearon e incubaron con un anticuerpo contra β-actina (mouse anti-actin, dilución 1:10,000, Cat. SAB2100878, GeneTex Inc, Irvine, CA) y su respectivo anticuerpo secundario (anti-mouse; Cat. 115-035-003, dilución 1:6,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA). La expresión de β-actina se usó como control de carga para normalizar los niveles de la expresión de las proteínas.

6.7 Inmunohistoquímica

6.7.1 Obtención y preparación del tejido

Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se sometieron a perfusión cardiaca con 250 ml/rata de una solución fría de PBS a pH 7.4 que contenía 10 U/ml de heparina, a una velocidad de 30 rpm. Posteriormente, se cambió la solución de perfusión por paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en PBS con ácido pícrico al 12%, con pH 7.4. A continuación, se realizó una laminectomía y se extrajo la región lumbar de la médula espinal y los GRD (L4-L6), los cuales se crioprotegieron en una solución de sacarosa al 30% durante 72 h. Finalmente, se cubrieron con un medio de congelación para corte óptimo (O.C.T. Tissue-Tek, Cat. 4583, Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.7.2 Inmunotinción

Se realizaron cortes transversales de 30 μm de la médula espinal y cortes longitudinales de 16 μm de los GRD con ayuda de un criostato (Leica CM1950, Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). Los cortes se colectaron en laminillas de vidrio previamente gelatinizadas y se mantuvieron a -20°C hasta su uso. El día del ensayo, los tejidos se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 min y se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con solución PBS. Se delimitó el área de los tejidos en cada laminilla con un plumón hidrofóbico (Pap Pen, Cat. XT001-PP, BioGenex, CA) y se colocó sobre los mismos una solución bloqueadora de PBS que contenía suero normal de burro (SNB) al 3% y Tritón X-100 al 0.3% durante dos horas. A continuación, se cambió la solución de bloqueo por una solución incubadora (PBS con SNB al 1% y Tritón X-100 al 0.1%) que contenía alguno de los anticuerpos primarios correspondientes a los marcadores de microglía (mouse anti-CD11b clone OX-42, dilución 1:100; Cat. MCA275G, ABD serotec, BioRad, CA) y astrocitos (mouse anti-GFAP, dilución 1:500; Cat. G3893, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se dejaron en incubación húmeda durante toda la noche a 4°C .

Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con solución PBS, se colocó sobre los tejidos solución incubadora que contenía el respectivo anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Cy2 (Cy2 AffiniPure donkey anti-mouse IgG, dilución 1:300; Cat. 715-225-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) y se dejaron en incubación húmeda durante dos horas a 4°C . Después se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con solución PBS y se llevó a cabo la deshidratación de los tejidos mediante lavados de dos min cada uno con soluciones crecientes de etanol (70, 80, 90 y 100%), y dos lavados más con xilol al 100%. Finalmente, los tejidos se cubrieron con medio de montaje DPX (Cat. 06522, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y un cubreobjetos. Las laminillas se observaron bajo un microscopio confocal (LSM 800, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania) con los objetivos de 10x y 63x. Las imágenes se analizaron con el software ZEN 2 Blue Edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania).

6.8 Análisis de datos y estadística

Los resultados conductuales se expresan como la media \pm el error estándar (EE) de seis animales por grupo, graficando el umbral de retiro o el umbral de presión muscular en función del tiempo. Posteriormente se determinó el área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales mediante el método de los trapezoides y se graficó la media \pm EE de las unidades de área para cada grupo.

Los resultados del *western blot* se presentan como la media \pm EE de tres animales por grupo graficando el porcentaje de intensidad relativa de las bandas con respecto a su control de carga.

Para determinar las diferencias entre los tratamientos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido por las pruebas de Bonferroni o Dunnett. Las diferencias estadísticas entre dos grupos se obtuvieron mediante la prueba t de Student. Para todos los casos, un valor de P menor a 0.05 se consideró significativo.

Todos los análisis y gráficos se realizaron con el programa estadístico Graphpad Prism 6.01 (GraphPad Inc. San Diego, CA, EUA).

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 Estandarización del modelo de fibromialgia

Inicialmente, los animales se habituaron a la manipulación y equipos correspondientes. En esas condiciones se determinaron los valores basales de las conductas nociceptivas (alodinia táctil e hiperalgesia muscular) en ambas patas traseras. Luego se administró el vehículo (ácido acético al 0.5%) o reserpina (1 mg/kg) por vía s.c. sobre el cuello de la rata, una vez al día durante tres días consecutivos. Posteriormente, se midieron las conductas en los días 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 después de la última inyección de reserpina (**Figura 12**).

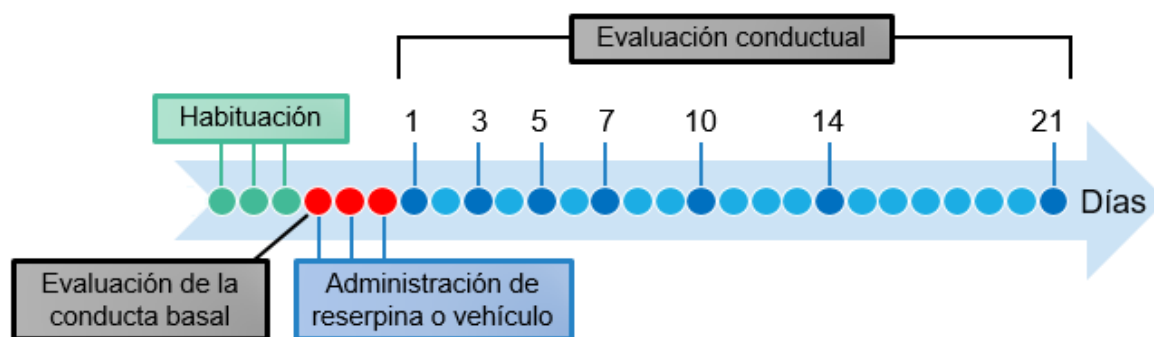


Figura 12. Diseño experimental de la evaluación conductual correspondiente a la estandarización del modelo de fibromialgia inducido por reserpina.

7.2 Evaluación farmacológica

Se utilizaron grupos independientes de seis ratas para cada conducta y dosis evaluada. Las ratas reserpinizadas de 7 días recibieron la inyección i.t. del vehículo (DMSO 30%) o dosis crecientes de L-655,708 (0.15-15 nmol) o TB21007 (1.5-150 nmol), agonistas inversos selectivos de los receptores GABA_A- α 5. El efecto antialodínico o antihiperalgésico se evaluó durante 8 horas en la pata derecha.

Para determinar el efecto de un antagonista de los receptores GABA_A, se administró una dosis efectiva de bicuculina (0.8 nmol) por vía i.t. en ratas reserpinizadas de 7 días y se evaluó la alodinia durante 8 horas (**Figura 13**).

Con la idea de demostrar la participación de los receptores GABA_A- α 5, se llevó a cabo otro experimento utilizando un agonista parcial de los receptores GABA_A- α 5, -2 y -3 sobre

el efecto de L-655,708. Para ello, las ratas reserpinizadas de 7 días recibieron por vía i.t. con la dosis más alta de L-655,708 (15 nmol) y 4 horas después se administró el L-838,417 (15 nmol). El efecto de la combinación se evaluó durante 4 horas más. De la misma manera, se determinó el efecto de la co-administración de ambos fármacos por vía i.t. En este caso, se determinó el efecto durante 8 horas.

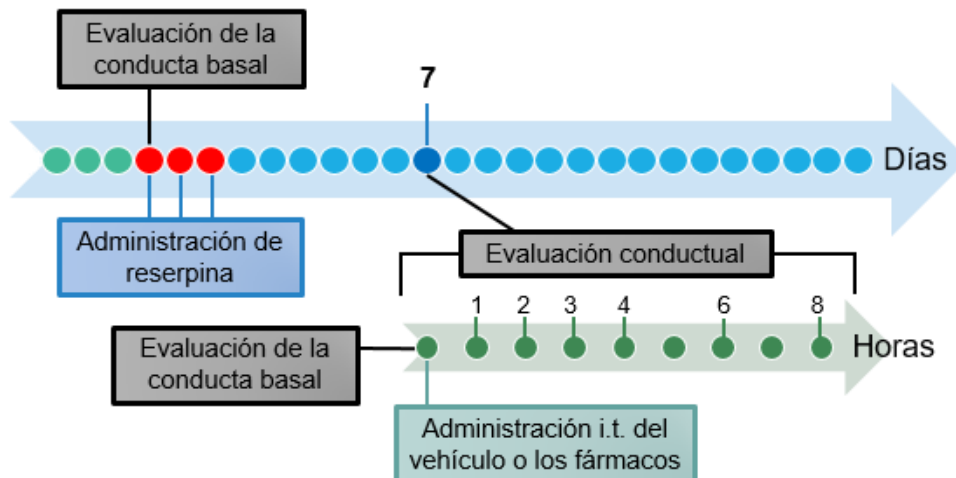


Figura 13. Diseño experimental de la evaluación del efecto antialodínico y antihiperalgésico de los fármacos en ratas reserpinizadas.

Por otro lado, se evaluó el efecto de las dosis más altas de los fármacos anteriores sobre las conductas nociceptivas en ratas *naïve*. La administración y el seguimiento del efecto se llevó a cabo de la misma manera que en las ratas reserpinizadas (**Figura 14**).

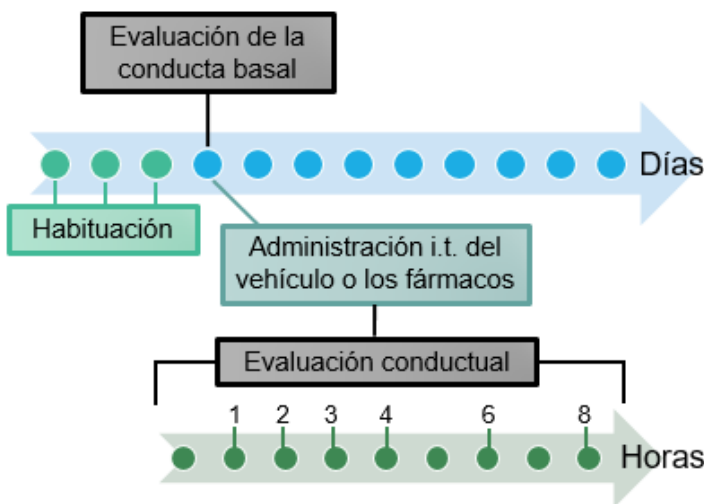


Figura 14. Diseño experimental de la evaluación del efecto antialodínico y antihiperalgésico de los fármacos en ratas *naïve*.

7.3 Esquema de administración de los siRNAs

Se utilizaron grupos independientes de seis animales. El siRNA dirigido a los receptores GABA_A-α5 o el siRNA control se administraron vía i.t. cada 24 horas durante tres días consecutivos, a partir del día 4 posterior a la última inyección de reserpina. Un grupo de ratas intactas también siguió el tratamiento con el siRNA dirigido a los receptores GABA_A-α5 (**Figura 15**). Además, se utilizaron como controles negativos un grupo de ratas reserpinizadas y otro de ratas intactas a las cuales no se inyectó ningún compuesto, pero que fueron manipulados y habituados de la misma manera que los grupos administrados, siguiendo el mismo curso temporal.

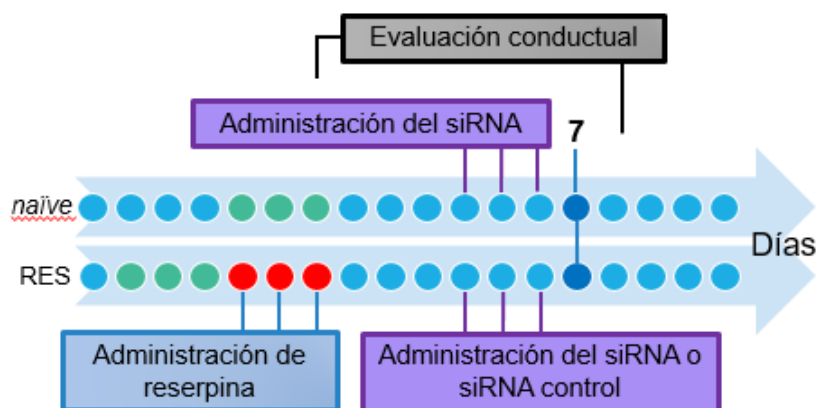


Figura 15. Diseño experimental de la administración i.t. de los siRNA contra los receptores GABA_A-α5.

7.4 Determinación de la expresión del receptor GABA_A-α5 por *western blot*

Se utilizaron grupos independientes de tres ratas. La médula espinal lumbar y los GRD L4-L6 de las ratas se obtuvieron en los días 1, 3, 7, 10 y 14 posteriores a la última inyección de reserpina. Con el objetivo de determinar la relación entre la expresión del receptor GABA_A-α5 y el efecto de los agonistas inversos de este receptor, se tomaron muestras de médula espinal y GRD de ratas reserpinizadas de 7 días tratadas con L-655,708 (15 nmol) y TB21007 (150 nmol) 4 o 6 horas después de su administración, respectivamente (**Figura 16**). Posteriormente, los tejidos se procesaron utilizando la técnica de *western blot*.

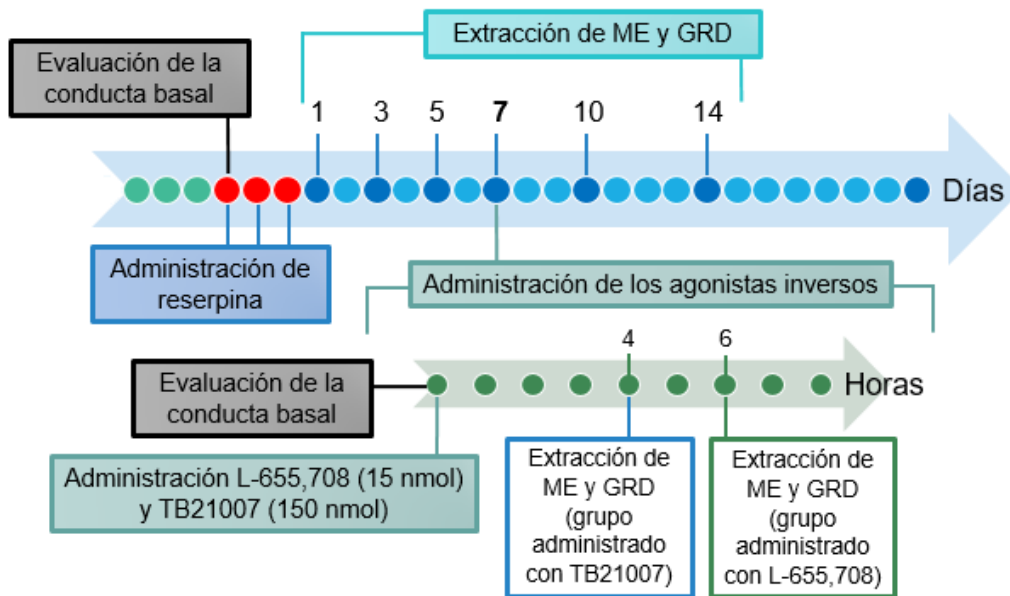


Figura 16. Diseño experimental de la extracción de médula espinal (ME) y ganglios de la raíz dorsal (GRD) para el *western blot*.

7.5 Inmunohistoquímica

Se utilizaron grupos independientes de dos ratas. La médula espinal lumbar y los GRD L4-L6 de las ratas se obtuvieron después de la perfusión correspondiente en el día 7 posterior a la última inyección de reserpina o vehículo (ácido acético glacial al 0.5%) (**Figura 17**). Por último, los tejidos se procesaron utilizando la técnica de inmunohistoquímica.

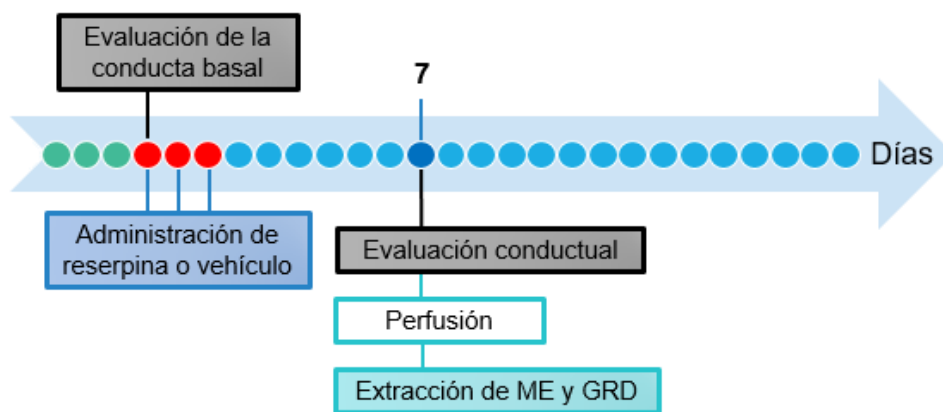


Figura 17. Diseño experimental de la extracción de médula espinal (ME) y ganglios de la raíz dorsal (GRD) para inmunohistoquímica.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización del modelo de fibromialgia inducida por reserpina

La inyección s.c. de reserpina (1 mg/kg por 3 días), pero no del vehículo (ácido acético glacial al 0.5%), indujo el desarrollo de hipersensibilidad generalizada en los animales, lo que representa la característica principal de la fibromialgia. En ratas hembra, el tratamiento con reserpina redujo el umbral de retiro (lo que se interpretó como alodinia táctil) en ambas patas traseras desde el día 1 después de la última inyección y persistió aún entre el día 10 y 14 (**Figura 18A**). El efecto máximo se presentó entre los 5 y 7 días posteriores a la última inyección de reserpina, donde se observó una disminución del umbral de aproximadamente 80% con respecto al grupo VEH. Además, la administración de reserpina también redujo el umbral de presión muscular, lo que se interpretó como hiperalgesia muscular. Este umbral disminuyó significativamente desde el día 1 después de la última inyección de reserpina en ambas extremidades. La respuesta persistió hasta el día 10 y se recuperó poco a poco después de ese tiempo (**Figura 18B**). El efecto máximo se observó en el día 7, donde el umbral de presión muscular disminuyó alrededor de 56% con respecto al grupo VEH.

La reserpina también redujo los umbrales de retiro y presión muscular en ratas macho. Esta reducción fue significativa desde el día 1 hasta el día 14 en ambas extremidades (**Figura 19**). Al igual que en las hembras, el efecto máximo se observó el día 7 posterior a la última administración de reserpina, en ambas patas traseras, con porcentajes de reducción similares: 85% para el umbral de retiro, y 57% para el umbral de presión muscular. Asimismo, al comparar únicamente los umbrales en la pata derecha, no hubo diferencias significativas en la alodinia táctil (**Figura 20A/C**) y en la hiperalgesia muscular (**Figura 20B/D**) entre los grupos de hembras y machos reserpinizados. En las gráficas del área bajo la curva, se observó que durante el curso temporal del modelo de fibromialgia hubo una disminución general del umbral de retiro del 42.3% en hembras y 44% en machos. En el caso de la hiperalgesia muscular, la disminución general del umbral de presión muscular fue del 20.4% en hembras y 18.4% en machos. Estos resultados demuestran la funcionalidad del modelo independientemente del sexo.

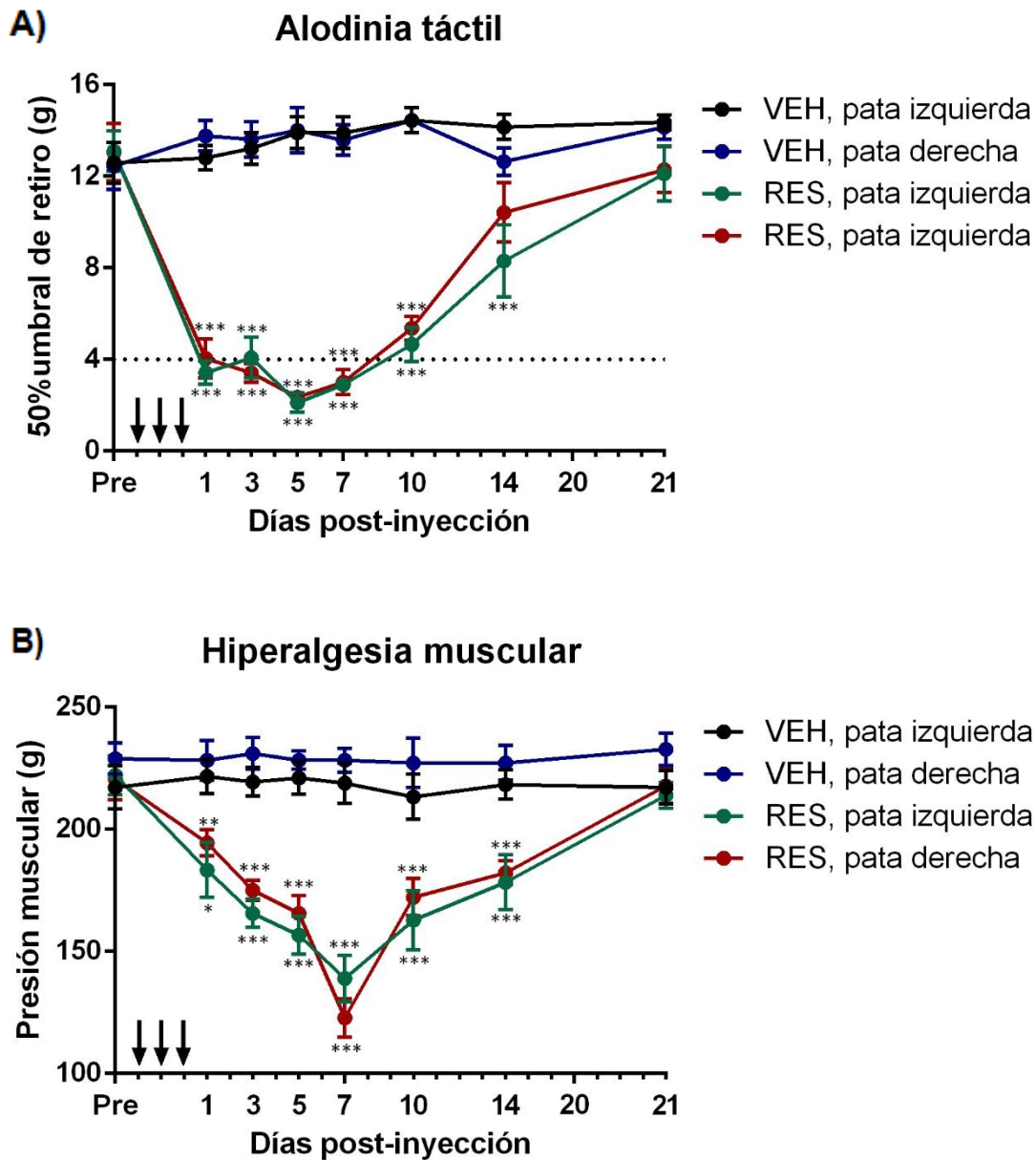


Figura 18. La reserpina produce alodinia táctil (A) e hiperalgnesia muscular (B) en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus grupo VEH, por ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Bonferroni. Las flechas indican los tiempos de inyección de reserpina (RES) o vehículo (VEH).

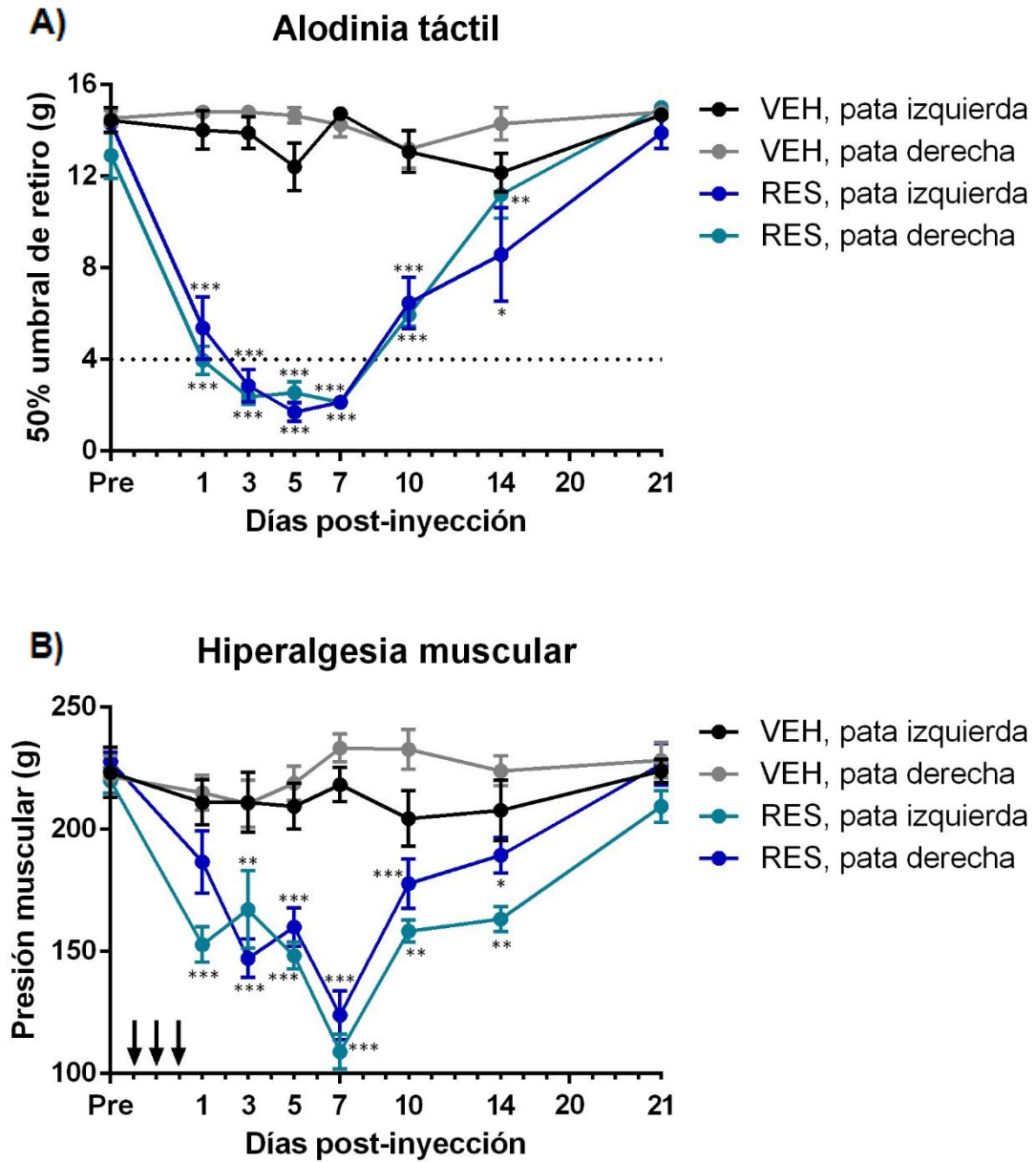


Figura 19. La reserpina produce alodinia táctil (A) e hiperalgnesia muscular (B) en ratas macho. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus grupo VEH, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. Las flechas indican los tiempos de inyección de reserpina (RES) o vehículo (VEH).

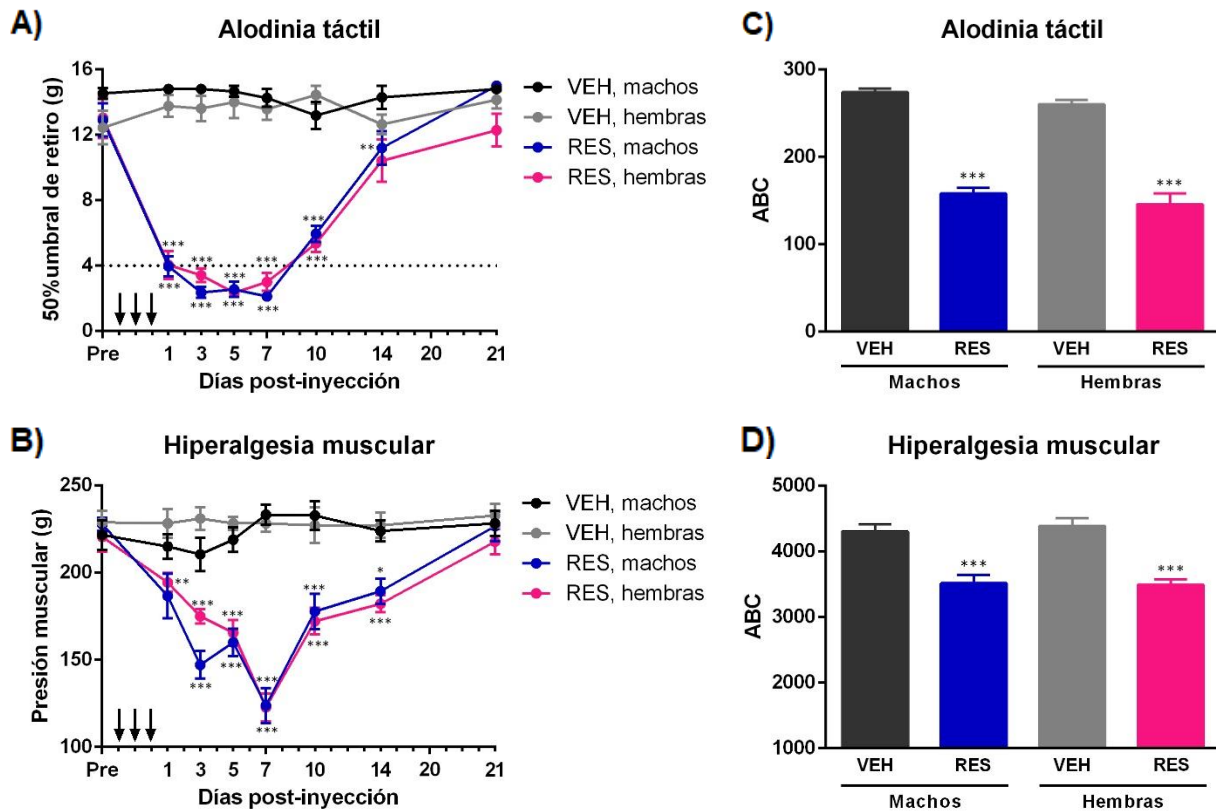


Figura 20. La reserpina produce hipersensibilidad en ratas macho y hembra de forma similar. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus grupo VEH para cada sexo, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. Las flechas indican los tiempos de inyección de reserpina o vehículo. **C) Área bajo la curva del curso temporal de la alodinia táctil en ratas macho y hembra. D) Área bajo la curva del curso temporal de la hiperalgnesia muscular en ratas macho y hembra.** Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. *** $p < 0.001$ versus grupo VEH para cada sexo, t de Student.

8.2 Evaluación farmacológica de la contribución de los receptores GABA_A- α 5 en las conductas nociceptivas en el modelo de fibromialgia

La administración intratecal de L-655,708, pero no del vehículo (DMSO 30%), incrementó de manera dosis dependiente el umbral de retiro y el umbral de presión muscular en las ratas hembras reserpinizadas (**Figura 21**). El efecto máximo se alcanzó a las 6 horas en ambas conductas, y en el caso de la alodinia táctil, el efecto persistió más de 8 horas. El efecto en la alodinia táctil fue más notable que en la hiperalgnesia muscular.

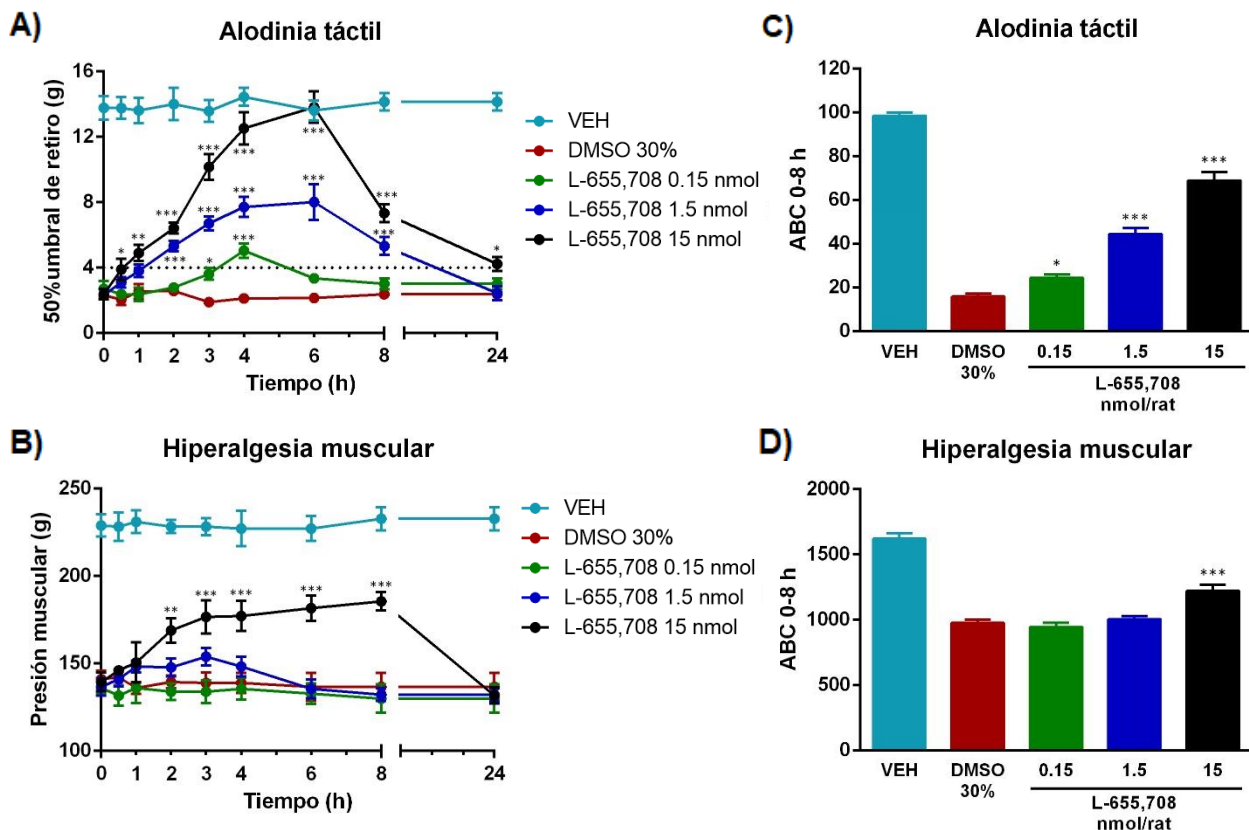


Figura 21. Efecto de la administración intratecal de L-655,708 en la alodinia táctil (A) e hiperalgnesia muscular (B) en ratas reserpinizadas. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus DMSO 30%, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett. Área bajo la curva del curso temporal de la alodinia táctil (C) y la hiperalgnesia muscular (D) en ratas reserpinizadas. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. *** $p < 0.001$ versus DMSO 30%, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

De igual forma la administración de TB21007, pero no del vehículo, incrementó parcialmente el umbral de retiro y el umbral de presión muscular en las ratas hembra reserpinizadas de manera dosis dependiente (**Figura 22**). El efecto máximo se registró a las 4 y 3 horas, respectivamente. Sin embargo, para el caso de la hiperalgnesia muscular, el incremento del umbral no fue estadísticamente significativo.

Estos resultados sugieren que los receptores GABA_A- $\alpha 5$ participan en la modulación de la alodinia táctil y en menor medida de la hiperalgnesia muscular en este modelo de fibromialgia.

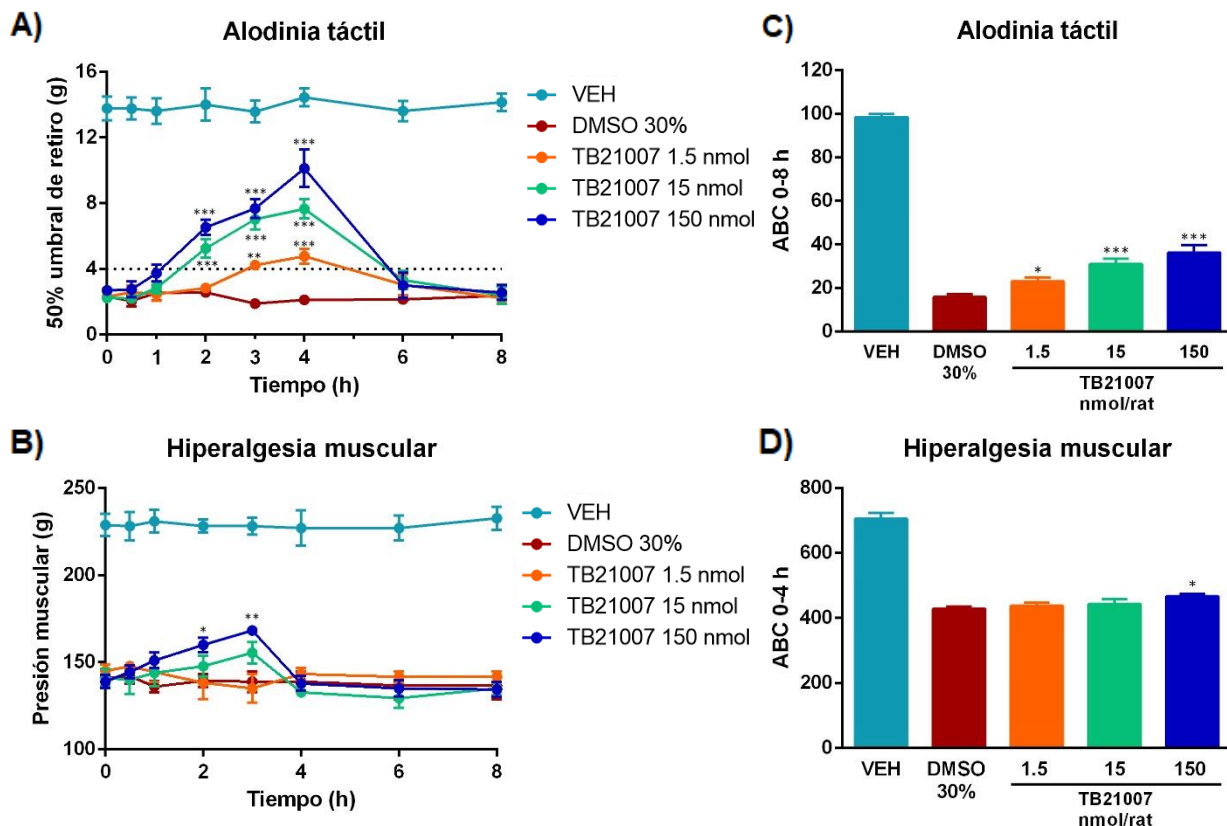


Figura 22. Efecto de la administración intratecal de TB21007 en la alodinia táctil (A) e hiperalgesia muscular (B) en ratas reserpinizadas. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus DMSO 30%, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett. **C) Área bajo la curva del curso temporal del efecto de TB21007 en la alodinia táctil en ratas reserpinizadas. D) Área bajo la curva del curso temporal del efecto de TB21007 en la hiperalgesia muscular en ratas reserpinizadas.** Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$ versus DMSO 30%, por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

Por otro lado, se evaluó el efecto de una dosis efectiva de L-838,417, agonista parcial de los receptores GABA_A con selectividad por las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$, sobre el efecto antialodínico producido por L-655,708. Como se observa en la **Figura 23**, la inyección i.t. de L-838,417 4 horas después de L-655,708 revierte el efecto antialodínico de este último. Además, cuando ambos fármacos se administraron de manera conjunta, el efecto antialodínico de L-655,708 tuvo una menor duración, comparado con el efecto que tiene *per se* en las ratas reserpinizadas a esa misma dosis (**Figura 24**).

El bloqueo del efecto L-655,708 producido por L-838,417 es otra evidencia de la participación de los receptores GABA_A- $\alpha 5$ en la modulación de la alodinia en este modelo de fibromialgia.

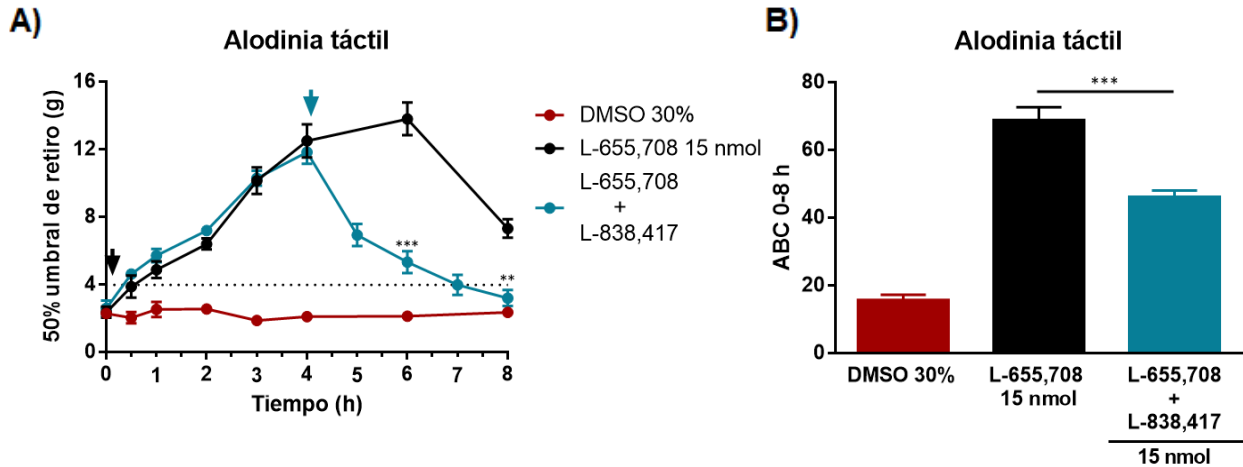


Figura 23. Efecto del post-tratamiento con L-838,417 sobre el efecto antialodínico producido por L-655,708 en ratas reserpinizadas. A) Curso temporal. Cada punto representa el promedio de 5-6 ratas \pm EE. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ versus L-655,708 15 nmol, por t de Student (método Sidak-Bonferroni de comparaciones múltiples). La flecha negra indica el tiempo de administración de L-655,708. La flecha azul indica el tiempo de administración de L-838,417. **B) Área bajo la curva del efecto antialodínico de L-655,708 y del post-tratamiento con L-838,417.** Representación del promedio de 5-6 ratas \pm EE. $***p < 0.001$ versus L-655,708 15 nmol. t de Student.

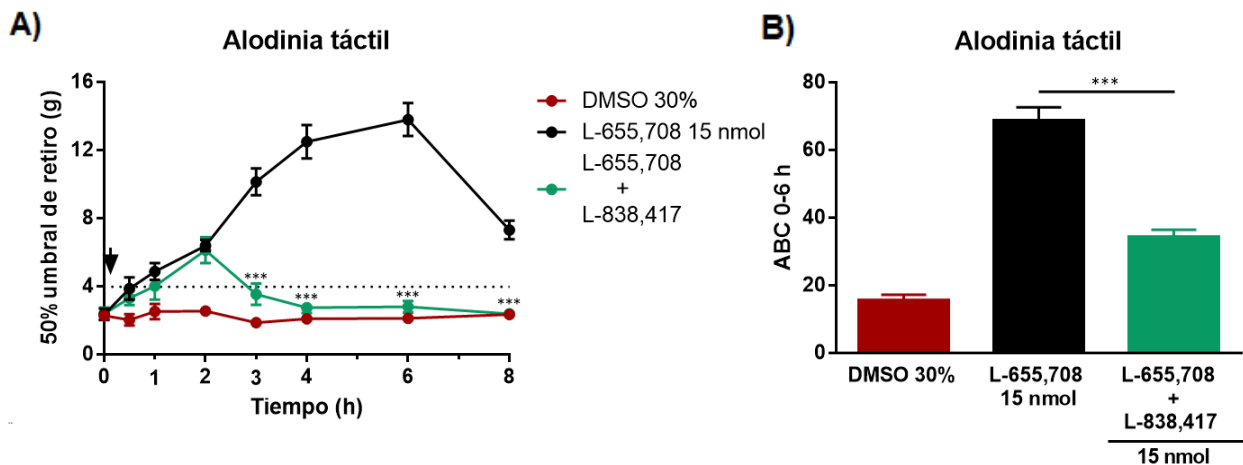


Figura 24. Efecto de la administración conjunta de L-655,708 y L-838,417 en la alodinia de ratas reserpinizadas. A) Curso temporal. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. $***p < 0.001$ versus L-655,708 15 nmol, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett. La flecha negra indica el tiempo de administración de L-655,708 o de la administración conjunta. **B) Área bajo la curva del efecto antialodínico de L-655,708 y L-838,417.** Representación del promedio de 5-6 ratas \pm EE. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ versus L-655,708 15 nmol, por t de Student.

De igual forma, la administración intratecal de una dosis efectiva de bicuculina, un antagonista competitivo de los receptores GABA_A, incrementó ligeramente el umbral de retiro en ratas hembra reserpinizadas (**Figura 25**). Sin embargo, este efecto fue muy modesto en comparación a los producidos por las dosis más altas de los agonistas inversos selectivos de los receptores GABA_A- α 5.

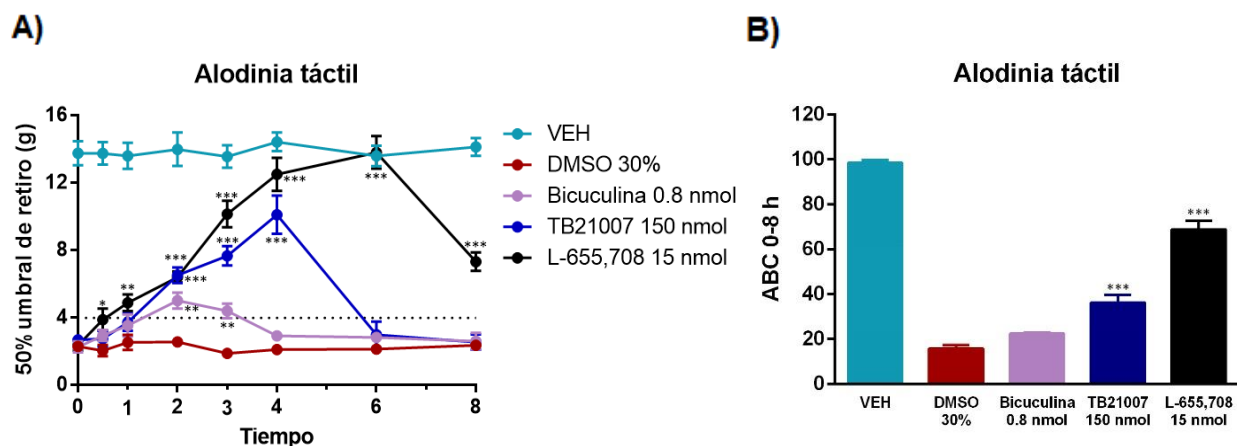


Figura 25. Efecto de la administración intratecal de bicuculina en comparación con en el efecto de L-655,708 y TB21007 en ratas reserpinizadas. A) Curso temporal. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ versus DMSO 30%, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. **B) Área bajo la curva del curso temporal del efecto antialodínico de bicuculina, L-655,708 y TB21007 en ratas reserpinizadas.** Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. $*p < 0.05$ versus DMSO 30%, por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

8.3 Evaluación farmacológica de la contribución de los receptores GABA_A- α 5 en la nocicepción de ratas intactas

Con la finalidad de evidenciar el papel de los receptores GABA_A- α 5 en condiciones no patológicas, las dosis más altas de ambos agonistas inversos se administraron vía intratecal en ratas *naïve*. En la **Figura 26** se observa que tanto L-655,708 como TB21007 indujeron conductas nociceptivas de manera parcial en las ratas intactas, especialmente alodinia (A/B). En este caso, el efecto alodínico fue comparable al producido por una dosis efectiva de bicuculina. Esto sugiere que en condiciones normales los receptores GABA_A- α 5 tienen un papel antinociceptivo.

La administración de DMSO al 30% produjo un efecto de hipersensibilidad transitoria. Sin embargo, al administrar únicamente H₂O, que constituye el otro 70% del vehículo, este efecto de reducción del umbral de retiro no se observó. Por lo tanto, el efecto pronociceptivo del DMSO se atribuyó a las propiedades irritantes propias de este compuesto.

El efecto de los fármacos sobre el umbral de presión muscular (B) fue muy sutil comparado con el efecto en el umbral de retiro, y al graficar el área bajo la curva (D) no se observó diferencia significativa.

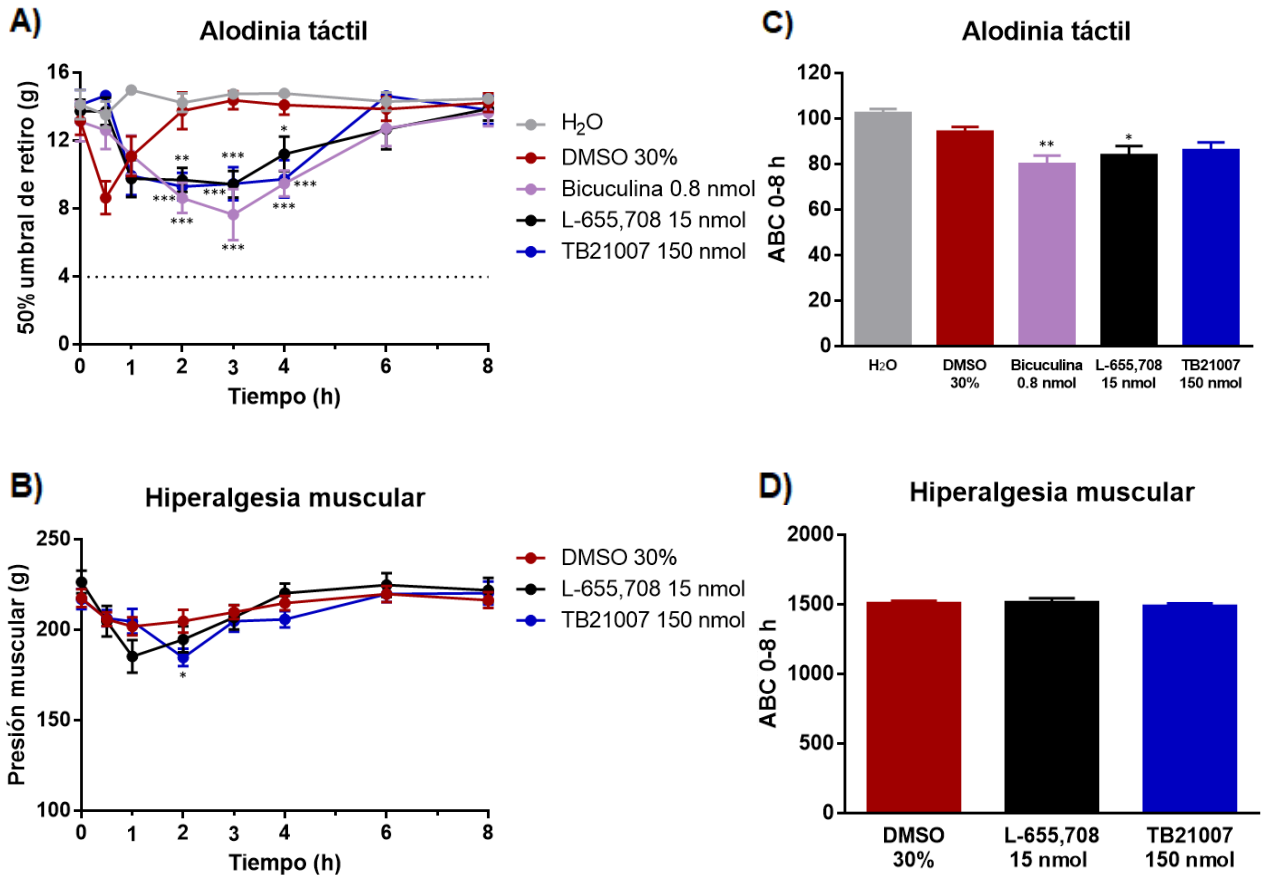


Figura 26. Efecto de la administración intratecal de L-655,708, TB21007 y bicuculina en ratas *naïve*. Los fármacos muestran efectos en la alodinia táctil (A) y en menor medida en la hiperalgnesia muscular (B). Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus DMSO 30%, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett. C) Área bajo la curva del curso temporal del efecto de bicuculina, L-655,708 y TB21007 en la alodinia en ratas reserpinizadas. D) Área bajo la curva del curso temporal del efecto de bicuculina, L-655,708 y TB21007 en la hiperalgnesia muscular en ratas reserpinizadas. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus DMSO 30%, por t de Student.

8.4 Evaluación farmacológica de los agonistas inversos del receptor GABA_A- α 5 en machos reserpinizados

Para determinar si los fármacos tenían un efecto dependiente del sexo en este modelo, se administraron las dosis más altas de los agonistas inversos de los receptores GABA_A- α 5 en ratas macho reserpinizados de 7 días y se evaluó su impacto en la alodinia. La **Figura 27A/C** muestra el efecto antialodínico de ambos fármacos en ratas hembra. Sin embargo, ambos tuvieron un efecto menor en ratas macho, que a pesar de ser significativo (**Figura 27B/D**), fue distinto al efecto producido en las ratas hembra. Finalmente, la **Figura 28** muestra un resumen comparativo de los efectos de L-655,708

(A/C) y de TB21007 (B/D) entre ambos sexos. Estos resultados sugieren que el efecto antialodínico del tratamiento con agonistas inversos de los receptores GABA_A-α5 es dependiente del sexo en ratas Wistar reserpinizadas.

Por el contrario, al evaluar el efecto de la dosis más alta de L-655,708 en machos intactos, no se observaron diferencias en el efecto pronociceptivo de este agonista inverso con respecto al efecto producido en las ratas hembra (Figura 29).

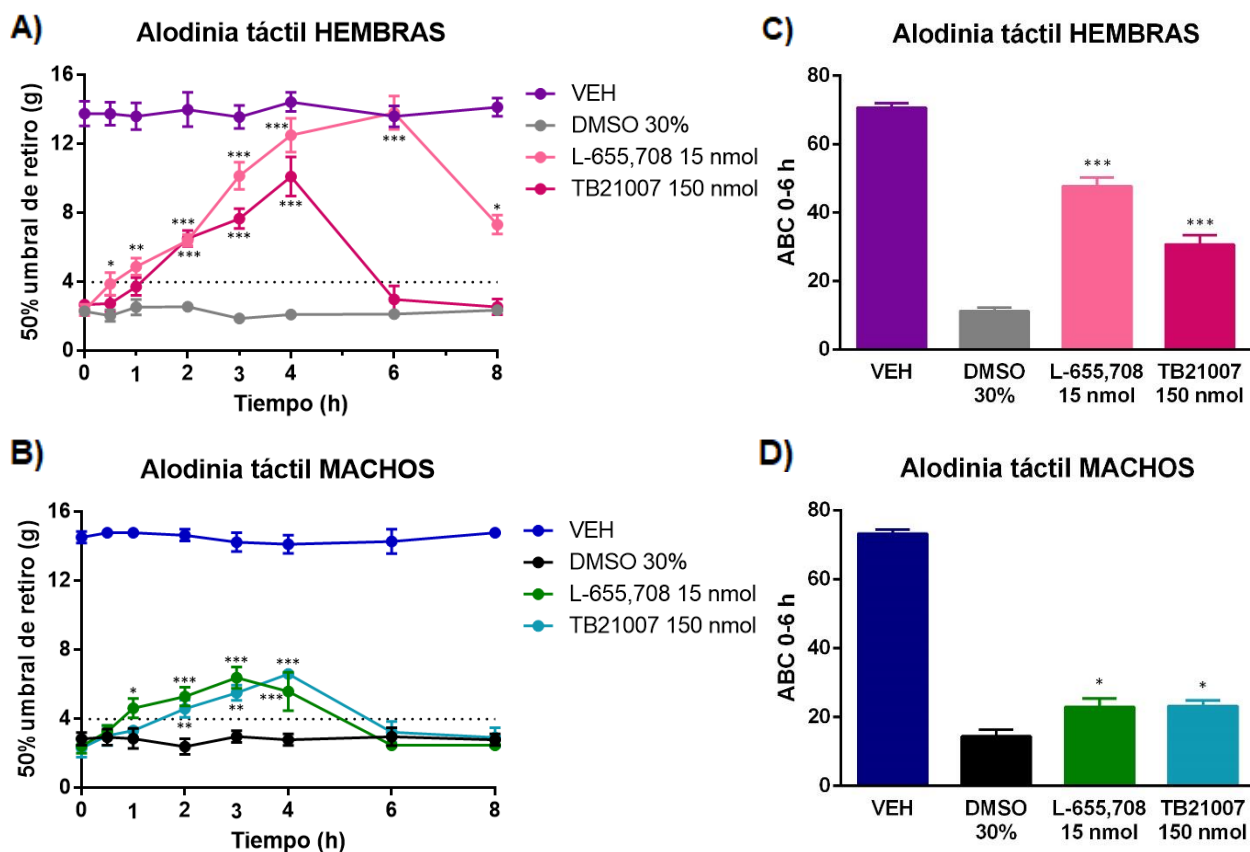


Figura 27. Efecto de la administración intratecal de L-655,708 y TB21007 sobre la alodinia de ratas hembras (A) y machos (B). Cada punto representa el promedio de 6 ratas ± EE. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 versus DMSO 30%, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett. C) Área bajo la curva del curso temporal del efecto antialodínico de L-655,708 y TB21007 en ratas hembra (C) y machos (D) reserpinizadas. Representación del promedio de 6 ratas ± EE. *p < 0.05, ***p < 0.001 versus DMSO 30% para cada fármaco, t de Student.

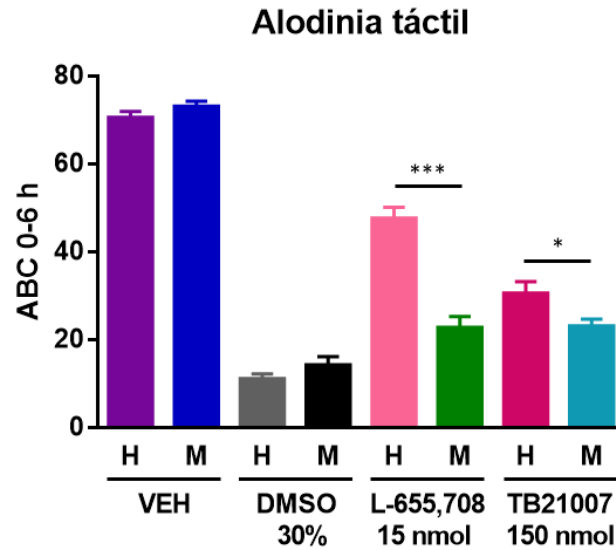


Figura 28. Resumen comparativo del efecto de los agonistas inversos del receptor $GABA_A-\alpha 5$ entre ratas hembras (H) y machos (M). Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, H versus M para cada fármaco, t de Student.

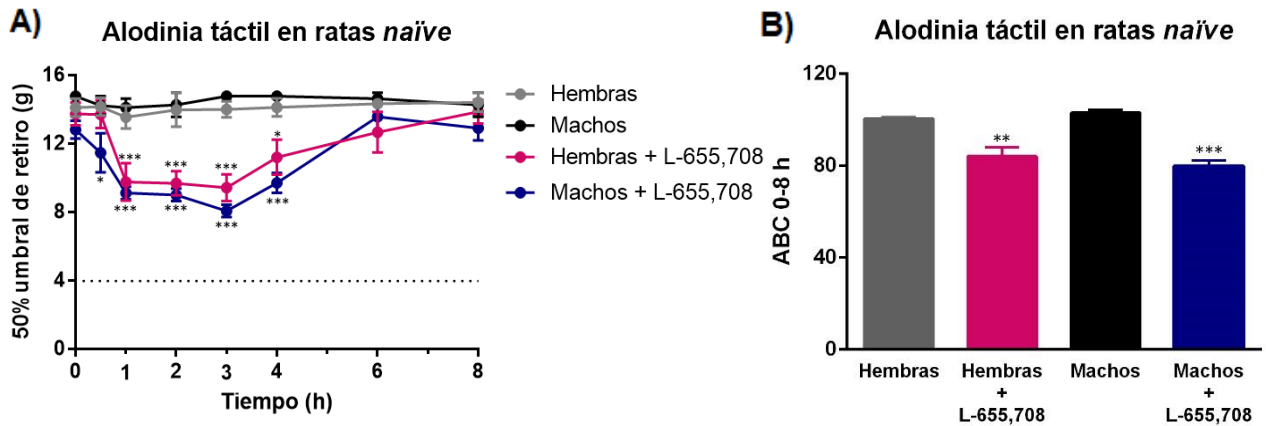


Figura 29. Comparación del efecto pronociceptivo de L-655,708 entre ratas hembras y machos *naïve*. **A) Curso temporal.** Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus grupo no administrado para cada sexo, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. **B) Área bajo la curva del curso temporal.** Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus grupo no administrado para cada sexo, t de Student.

8.5 Efecto del *knockdown* de los receptores GABA_A-α5 sobre las conductas nociceptivas inducidas por reserpina

Otra manera de evaluar la participación de los receptores GABA_A-α5 en la hipersensibilidad inducida en el modelo de fibromialgia consistió en el tratamiento vía i.t. con siRNAs dirigidos a estos receptores. Como se observa en la **Figura 30**, la administración del siRNA de GABA_A-α5, pero no del siRNA control, incrementó el umbral de retiro en las ratas reserpinizadas. Este efecto se observó desde 24 horas después de la primera administración del siRNA y se revirtió 24 horas después de la última inyección, sugiriendo un *knockdown* transitorio.

En contraste, la administración del siRNA de GABA_A-α5 en ratas intactas (**Figura 31**) produjo hipersensibilidad que se observó desde 24 horas después de la primera inyección. El umbral de retiro regresó a valores normales 24 horas después de la última dosis del siRNA.

Estos datos definen de una manera más precisa la participación de los receptores GABA_A-α5 en la alodinia táctil generada en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina.

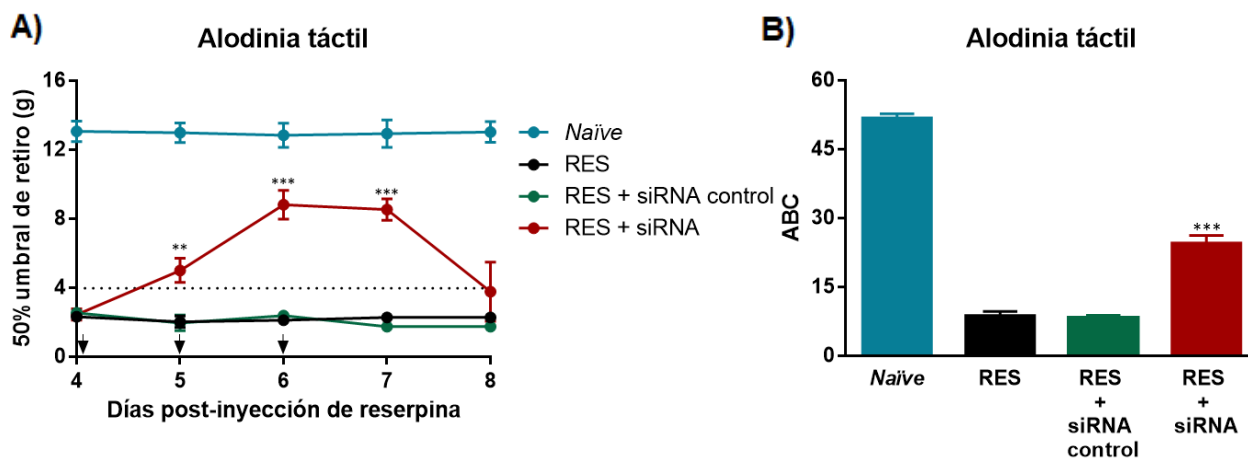


Figura 30. Efecto del tratamiento con un siRNA dirigido a los receptores GABA_A-α5 sobre el umbral de retiro en ratas reserpinizadas. A) Curso temporal. Cada punto representa el promedio de 4-6 ratas ± EE. **p < 0.01, ***p < 0.001 *versus* RES, por t de Student (método Sidak-Bonferroni de comparaciones múltiples). Las flechas indican tiempo de administración del siRNA de GABA_A-α5 o del siRNA control. **B) Área bajo la curva del efecto antinociceptivo del tratamiento con siRNAs.** Representación del promedio de 4-6 ratas ± EE. ***p < 0.001 *versus* RES, por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

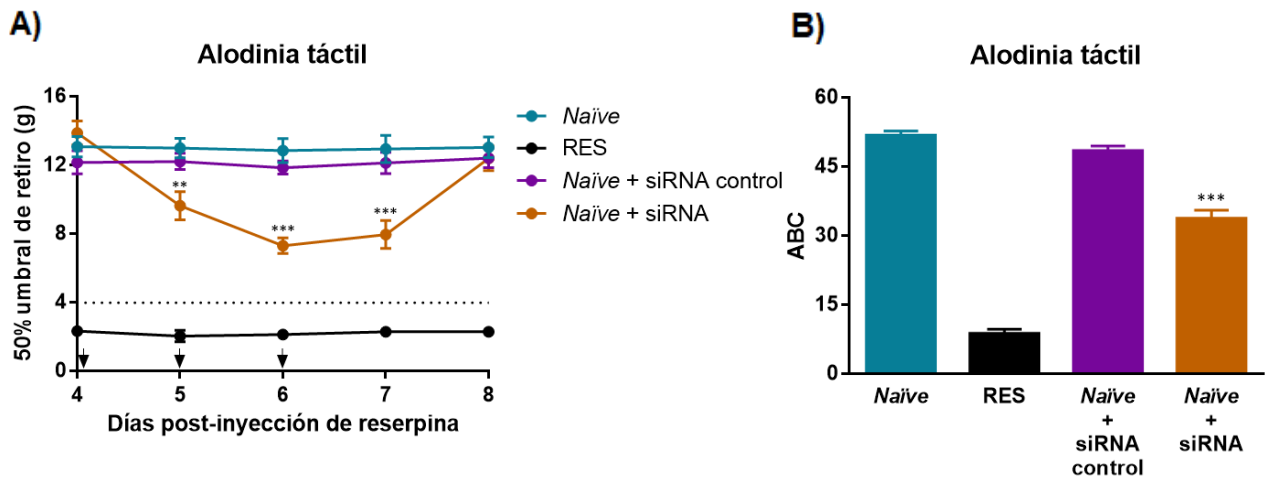


Figura 31. Efecto del tratamiento con un siRNA dirigido a los receptores GABA_A- α 5 sobre el umbral de retiro en ratas *naïve*. A) Curso temporal. Cada punto representa el promedio de 4-6 ratas \pm EE. **p < 0.01, *p < 0.001 *versus* grupo *Naïve*, por t de Student (método Sidak-Bonferroni de comparaciones múltiples). Las flechas indican tiempo de administración del siRNA de GABA_A- α 5. B) Área bajo la curva del efecto del tratamiento con siRNAs en ratas *naïve*. Representación del promedio de 4-6 ratas \pm EE. ***p < 0.001 *versus* grupo *Naïve*, t de Student.**

8.6 Determinación de la expresión de la proteína de los receptores GABA_A- α 5 en el modelo de fibromialgia

El *western blot* reveló una banda de aproximadamente 55 kDa correspondiente al peso molecular esperado para la proteína de los receptores GABA_A- α 5, la cual se expresa constitutivamente en médula espinal y GRD. La reserpina incrementó la expresión de la proteína tanto en médula espinal como GRD en el día 7 posterior a la última inyección de reserpina en ratas hembra (**Figura 32**). Los datos sugieren que la reserpina aumenta la expresión de los receptores GABA_A- α 5 a nivel espinal y periférico.

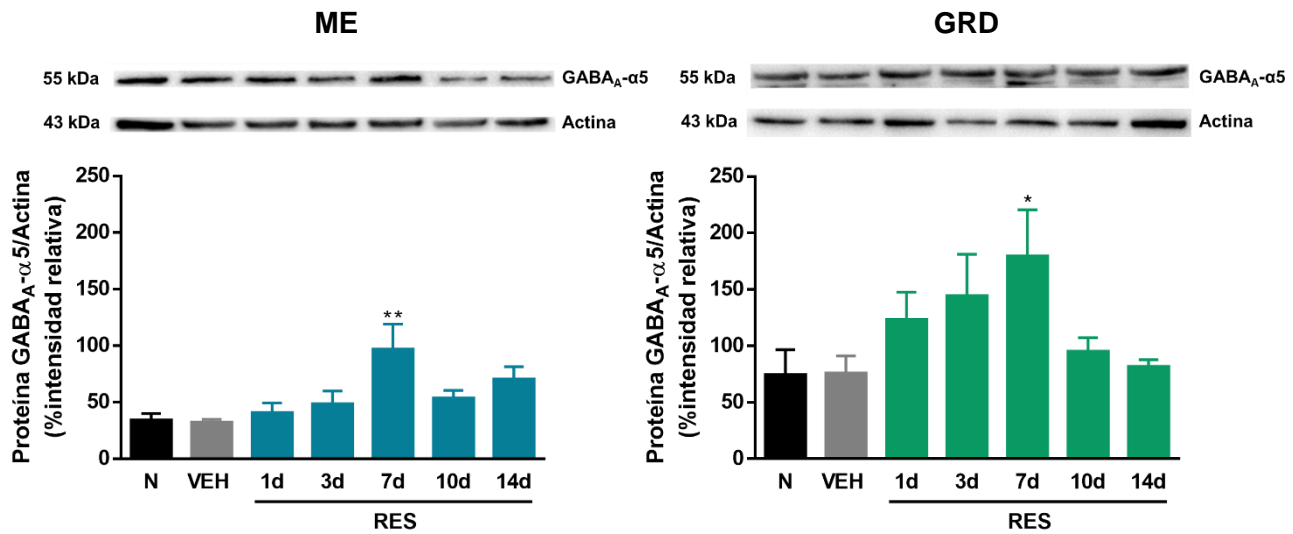


Figura 32. Expresión de la proteína de los receptores GABA_A-α5 en médula espinal (ME) y GRD después de la administración de reserpina (RES). Cada barra representa el promedio de 3 ratas ± EE. *p < 0.05, **p < 0.01 versus la expresión del grupo VEH, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

Además, la administración intratecal de los agonistas inversos en el día 7 posterior a la última inyección de reserpina redujo el porcentaje de expresión tanto en médula espinal como en los GRD (Figura 33).

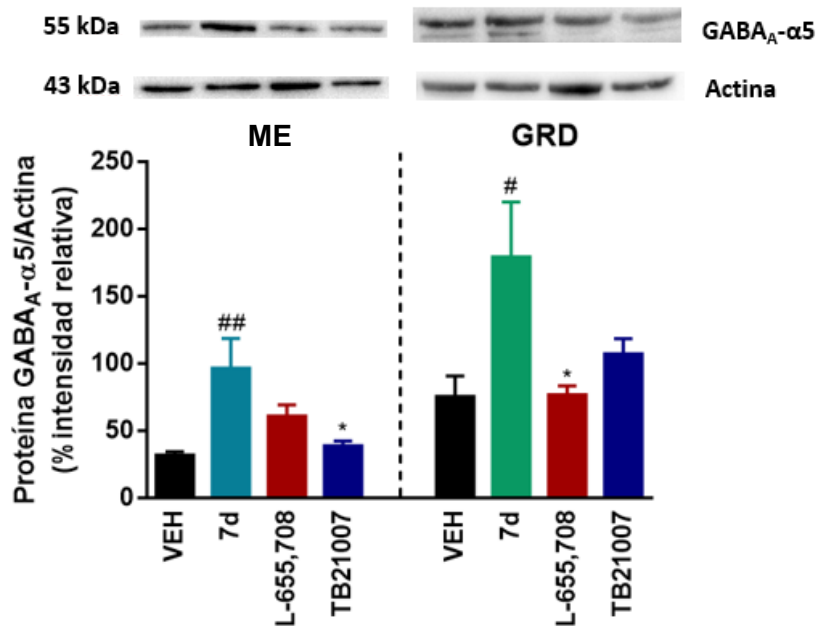


Figura 33. Efecto de la administración intratecal de los agonistas inversos sobre la expresión de la proteína de los receptores GABA_A-α5 en médula espinal (ME) y GRD. Cada barra representa el promedio de 3 ratas ± EE. #p < 0.05 versus grupo VEH, ##p < 0.01 versus grupo VEH; *p < 0.05 versus grupo 7d, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

8.7 Activación de la glía espinal en el modelo de fibromialgia

La administración de reserpina incrementó la inmunoreactividad de OX-42 y de GFAP (**Figura 34**), lo cual se interpreta como la activación de la microglía y los astrocitos en la médula espinal, respectivamente. La inmunoreactividad de ambos marcadores fue similar entre las ratas *naïve* y las ratas VEH, sugiriendo que el vehículo no activa la glía espinal y por lo tanto no afecta la nocicepción observada en este modelo de fibromialgia.

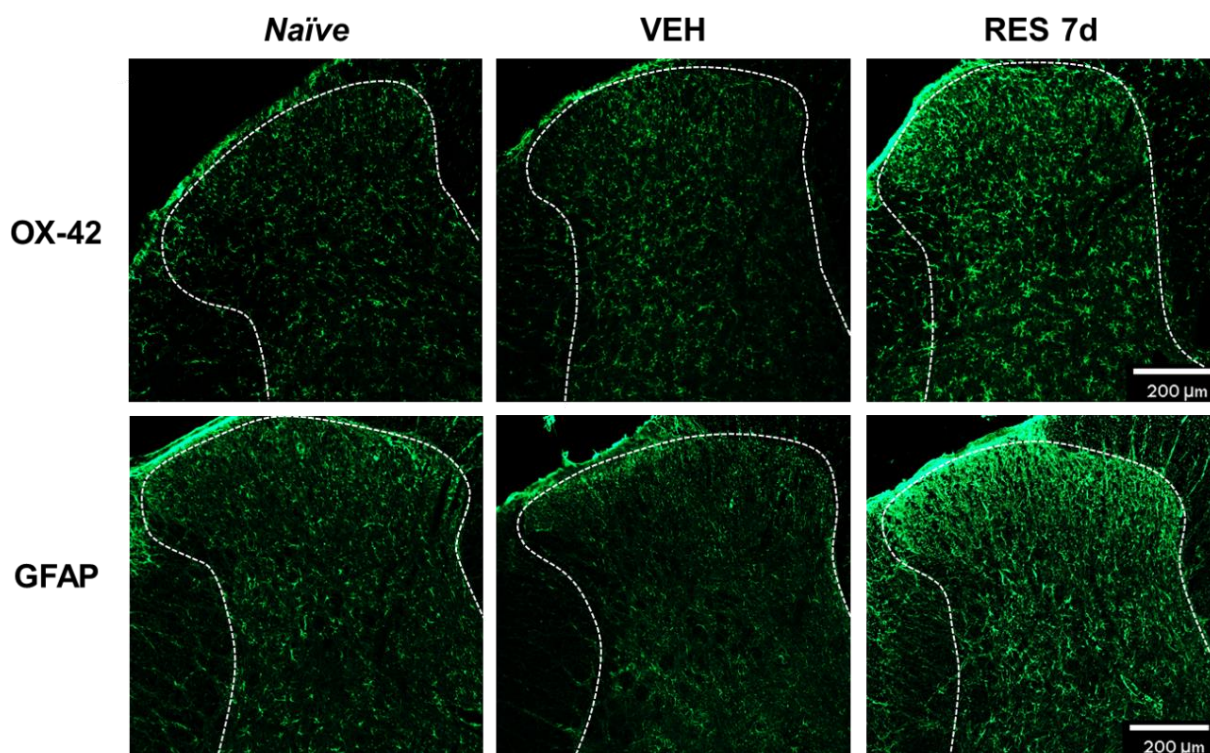


Figura 34. Inmunorreactividad de los marcadores de microglía (OX-42) y astrocitos (GFAP) en la médula espinal. Imágenes representativas del asta dorsal (línea punteada) de la médula espinal de ratas *naïve*, ratas administradas con vehículo (VEH) y ratas reserpinizadas de 7 días (RES). Escala 200 μm.

9. DISCUSIÓN

9.1 La reserpina produce conductas nociceptivas en ratas hembras y machos

La administración de reserpina (1 mg/kg, 3 días) produjo hipersensibilidad mecánica y muscular en ratas machos y hembras. Nuestros datos están de acuerdo con estudios pioneros que demostraron que la reserpina produce hipersensibilidad térmica en machos (Kulkarni, 1980; Kulkarni y Robert, 1982). Además, los resultados concuerdan con estudios más recientes donde se encuentra que la reserpina produce alodinia mecánica, alodinia al frío e hiperalgesia muscular indistintamente en ratas hembras y machos (Nagakura *et al.*, 2009, 2012; Arora *et al.* 2011; Ogino *et al.*, 2013; Kaneko *et al.*, 2014; Blasco-Serra *et al.* 2015; Murai *et al.*, 2015; Taguchi *et al.* 2015; Zhang *et al.*, 2016; Hernandez-Leon *et al.*, 2017). Este efecto de la reserpina también se ha demostrado en ratones (de Souza *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 2014, 2016). Se demostró que la reserpina induce conductas nociceptivas independientemente de la fase del ciclo estral en que se encuentren las ratas hembra (Hernandez-Leon *et al.*, 2017).

Nuestros datos con reserpina son similares a los reportados en otros modelos de fibromialgia inducidos con salina ácida (Sluka *et al.*, 2001; Skyba *et al.*, 2002; Sluka *et al.*, 2003; Hoeger-Bement y Sluka, 2003; Gandhi *et al.*, 2004; Sluka y Audette, 2006; Chen *et al.*, 2014b; Lin *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2017; Siqueira-Lima *et al.*, 2017; Yen *et al.*, 2017), PGE₂ (*priming*) (Alvarez *et al.*, 2014; Tillu *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015), estrés (Khasar *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Dina *et al.*, 2011; Green *et al.*, 2011; Yasui *et al.*, 2014; Nazeri *et al.*, 2017) o daño por isquemia/reperfusión (Ross *et al.*, 2016) en ratas y/o ratones.

En nuestras condiciones la reserpina produjo alodinia mecánica e hiperalgesia muscular en ambas patas, lo que sugiere que esta sustancia da lugar a un modelo de dolor generalizado. Estos resultados son similares a los reportados con este compuesto (Nagakura *et al.*, 2009) y con otras sustancias o estrés para inducir el modelo de fibromialgia (Sluka *et al.*, 2001; Suarez-Roca *et al.*, 2006; Nishiyori y Ueda, 2008). En conjunto, los resultados sugieren que la administración de reserpina produce un patrón de hipersensibilidad nociceptiva generalizada que simula al dolor que se presenta en el ser humano con fibromialgia.

A la fecha se desconoce con precisión la fisiopatología de la fibromialgia. Sin embargo, hay varios estudios en animales utilizando el modelo de reserpina que sugieren la participación de diversos mecanismos de dolor. Se sabe que la reserpina se une de manera irreversible al transportador vesicular de monoaminas (VMAT) impidiendo el almacenamiento de NA, DA y 5-HT en vesículas mediante un proceso independiente de Ca^{2+} (Mandela *et al.*, 2010). Esto resulta en la inhibición de la secreción de catecolaminas que interrumpe la activación de sus receptores en el sistema nervioso central. La depleción de estos neurotransmisores podría ocasionar un desbalance entre los sistemas inhibidores y facilitadores de la modulación descendente del dolor, favoreciendo la facilitación y llevando a un aumento generalizado en la sensibilidad nociceptiva (Vanegas y Schaible, 2004; Ossipov *et al.*, 2014). Esta alteración se ha asociado a fibromialgia (Ablin y Buskila, 2013; de Zanette *et al.*, 2014; Meeus *et al.*, 2015), síndrome del colon irritable (Williams *et al.*, 2013; Jarrett *et al.* 2014), pancreatitis (Bouwense *et al.* 2013) y artritis reumatoide (Meeus *et al.*, 2015).

La serotonina es un neurotransmisor del sistema de modulación descendente del dolor. Se ha sugerido que la activación de los receptores 5-HT_{2C} espinales reduce la hiperalgesia muscular inducida por reserpina en ratas (Ogino *et al.* 2013) o por estrés por frío en ratones (Nishiyori *et al.*, 2010). Sin embargo, otros estudios han reportado que la activación de receptores 5-HT_{2C} espinales promueve el dolor en el modelo de formalina de larga duración (un modelo de dolor generalizado) (Cervantes-Durán *et al.*, 2013). Las diferencias se podrían deber al uso de agonistas no selectivos o al modelo de dolor utilizado. Por lo tanto, la relevancia de los receptores 5-HT_{2C} en la fibromialgia requiere de más investigación. Otros trabajos han demostrado que la activación de los receptores 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ a nivel espinal promueve el desarrollo y mantenimiento de alodinia e hiperalgesia en el modelo de formalina de larga duración (Bravo-Hernández *et al.*, 2012; Godínez-Chaparro *et al.*, 2012). La participación de estos receptores serotoninérgicos excitadores (5-HT₃₋₇), así como de los receptores inhibidores (5-HT_{1/5}) no se ha estudiado en ningún modelo de fibromialgia.

Se ha encontrado de manera consistente que los canales sensibles a ácido ASIC3 participan en la hipersensibilidad nociceptiva en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina o salina ácida. Por ejemplo, se ha reportado que la reserpina aumenta la

expresión del ARNm de ASIC3 en GRD, mientras que la toxina APETx2 (inhibidor selectivo de ASIC3) reduce la hipersensibilidad mecánica en el modelo (Taguchi *et al.*, 2015). Otros autores han demostrado que la inyección de salina ácida aumenta la expresión del ARNm de ASIC3 en GRD, médula espinal y tálamo y ese efecto se previene en ratones *knockout* de ASIC3 (Yen *et al.*, 2017). Además de los canales ASIC3, algunos autores han reportado que la solución salina ácida aumenta la expresión del ARNm de los canales de sodio Nav1.7 y Nav1.8 en GRD y médula espinal (Yen *et al.*, 2017). Asimismo, se ha demostrado que los canales de calcio Cav3.2, canales TRPV1 y canales Nav1.8 participan en la hiperalgesia inducida por salina ácida (Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014b). Dado que la reserpina produce algunos de los cambios inducidos por salina ácida, es probable que los mecanismos activados en el modelo de fibromialgia por salina ácida también se activen por reserpina. Esto aún requiere de investigación.

9.2 Los receptores GABA_A- α 5 participan en el mantenimiento de la hipersensibilidad inducida por reserpina

Los resultados de este estudio sugieren que los receptores GABA_A- α 5 espinales participan en la modulación de la alodinia táctil e hiperalgesia muscular inducidas por reserpina. Esta observación está sustentada en los siguientes hallazgos: 1) La inyección i.t. de L-655,708 y TB21007, agonistas inversos selectivos de la subunidad α 5, reduce las conductas nociceptivas; 2) la inyección i.t. de L-838,417, agonista parcial de los receptores GABA_A- α 5, revierte el efecto antinociceptivo del L-655,708; y 3) el tratamiento con el siRNA dirigido a los receptores GABA_A- α 5 disminuye la alodinia mecánica en ratas reserpinizadas. A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que evalúa el papel de los receptores GABA_A- α 5 en un modelo de dolor funcional en la rata. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios previos que demostraron el efecto antinociceptivo de L-655,708 en los modelos de formalina, formalina de larga duración y ligadura de nervios espinales (Bravo-Hernández *et al.*, 2014, 2016). En este sentido, otro agonista inverso de los receptores GABA_A- α 5 (α 5IA-II) reduce la nocicepción en el modelo de formalina (Munro *et al.*, 2011). Por su parte, el TB21007 también mostró un efecto analgésico significativo en el modelo de fibromialgia, aunque fue menor en comparación con el L-655,708 y se

requirió una dosis más grande. Estas diferencias podrían residir en las propiedades farmacocinéticas y estructurales de ambos fármacos (Chambers *et al.*, 2003; Atack *et al.*, 2006). A nuestro conocimiento, este es el primer estudio que evalúa el efecto de TB21007 en la nocicepción.

Estudios previos han demostrado que el bloqueo de los receptores GABA_A reduce las conductas nociceptivas en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Baba *et al.*, 2003; García-Nicas *et al.*, 2006; Bravo-Hernández *et al.*, 2014). En el modelo de fibromialgia inducida por reserpina, la administración i.t. de bicuculina (0.8 nmol) revirtió parcialmente la alodinia. No obstante, este efecto fue muy modesto en comparación con el producido por L-655,708 y TB21007. Dado que el efecto antinociceptivo en este modelo podría estar mediado por el bloqueo selectivo de los receptores GABA_A-α5, el efecto antialodínico modesto inducido por bicuculina podría explicarse por la baja afinidad de la ésta por el receptor GABA_A-α5 (pKi 5.7) en comparación de la afinidad de los agonistas inversos (pKi 9.3 y 8.8) (Quirk *et al.*, 1996; Ebert *et al.*, 1997; Chambers *et al.*, 2003).

Los resultados de este trabajo muestran que el bloqueo de los receptores GABA_A-α5 tuvo un efecto menor sobre el umbral de presión muscular. Existe evidencia de que la hiperalgesia muscular podría estar mediada por la presencia de factores inflamatorios (Mizumura, 2009) en algunos modelos de fibromialgia (Sluka *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2012; Dina *et al.*, 2008b). En este modelo, se ha sugerido que el estrés oxidativo podría participar en las alteraciones que se producen en las fibras musculares en ratas reserpinizadas (Favero *et al.*, 2017). Nuestros resultados sugieren que los receptores GABA_A-α5 desempeñan un papel secundario en la modulación de la hiperalgesia muscular en este modelo de fibromialgia.

Nuestros datos con los agonistas inversos del receptor GABA_A-α5 (L-655,708 y TB21007) sugieren la participación de estos receptores en la alodinia táctil y, en menor grado, hiperalgesia muscular, inducida por reserpina. Con el fin de corroborar esta participación, utilizamos al L-838,417, un agonista parcial de los receptores GABA_A con selectividad α5>α2>α3 (McCabe *et al.*, 2004). La administración i.t. de L-838,417 revirtió el efecto antialodínico producido por el L-655,708, sugiriendo que el efecto antialodínico observado con L-655,708 efectivamente se debe al bloqueo de los receptores GABA_A-α5. Esto concuerda con estudios previos donde el pre-tratamiento con L-838,417 atenúa el efecto

antialodínico y antihiperálgico en el modelo de formalina de larga duración (Bravo-Hernández *et al.*, 2016). En contraste, se ha reportado que el L-838,417 tiene un efecto antinociceptivo en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Knabl *et al.*, 2008, 2009; Di Lio *et al.*, 2011; Nickolls *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2012; Reichl *et al.*, 2012). Sin embargo, el efecto analgésico de L-838,417 en estas condiciones podría estar mediado por las subunidades $\alpha 2$ y/o $\alpha 3$, mientras que el efecto pronociceptivo podría estar relacionado únicamente con la subunidad $\alpha 5$, como sucede en el presente trabajo.

Dado que se podría argumentar que tanto el agonista como los antagonistas utilizados en este trabajo no son altamente selectivos para el receptor GABA_A- $\alpha 5$, decidimos utilizar un siRNA dirigido contra los receptores GABA_A- $\alpha 5$. El tratamiento i.t. con el siRNA dirigido a los receptores GABA_A- $\alpha 5$ disminuyó la alodinia en ratas reserpinizadas, lo que apoya nuestra idea de que los receptores GABA_A- $\alpha 5$ participan en la hipersensibilidad inducida por reserpina en nuestro modelo de fibromialgia. Los siRNAs son moléculas de doble cadena de 21-23 nucleótidos que inducen la degradación del ARNm al que son complementarios de manera específica a través de su unión a un complejo proteico. Esto resulta en la reducción de la expresión (*knockdown*) de las proteínas que codifican (Elbashir *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2002). Estudios previos han demostrado que el tratamiento i.t. con siRNAs específicos de receptores como P2X₃, TRPV1, TLR4, TrkB, NK₁, fosfodiesterasa 4B, SKIP y la subunidad NR2B del receptor NMDA atenúa las conductas nociceptivas en modelos de dolor neuropático e inflamatorio en ratas (Dorn *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2005; Christoph *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Naono-Nakayama *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Nuestro estudio es el primero que evalúa los efectos de un siRNA en un modelo de dolor funcional. Tomados juntos, nuestros resultados sugieren de manera contundente que los receptores GABA_A- $\alpha 5$ son los responsables de la hipersensibilidad inducida por reserpina en la rata. En contraste, se reportó recientemente que los receptores GABA_A- $\alpha 5$ ejercen un efecto antinociceptivo (protector) en condiciones de dolor inflamatorio en ratones *knockout* del receptor GABA_A- $\alpha 5$ (Perez-Sanchez *et al.*, 2017). Las diferencias se podrían deber a los mecanismos compensatorios generados al inducir el *knockout* del receptor (El-Brolosy y Stainier, 2017). Por ejemplo, la expresión del ARNm o de la proteína de los receptores GABA_A- δ , que también modulan la inhibición tónica en la médula espinal (Bonin *et al.*, 2011), podría

estar regulada a la alta en los ratones *knockout* para compensar las funciones de los GABA_A-α5 en la nocicepción. En apoyo a esto, nuestros datos muestran que el *knockdown* transitorio de los receptores GABA_A-α5 inducido por la administración i.t. del siRNA disminuye la alodinia táctil en las ratas fibromiálgicas. Esto sugeriría que la reserpina aumenta la expresión del ARNm de los receptores GABA_A-α5. Sin embargo, aún es necesario corroborar la expresión del ARNm mediante experimentos moleculares antes y después del tratamiento con el siRNA.

El papel de los receptores GABA_A en el dolor crónico es controvertido. En animales *naïve*, los agonistas y antagonistas del receptor GABA_A producen antinocicepción y pronocicepción, respectivamente (Sivilotti y Woolf, 1994; Dirig y Yaksh, 1995; Baba *et al.*, 2003). No obstante, el daño al tejido o al nervio parecen cambiar la función de los receptores GABA_A, pasando de inhibición a pérdida de la inhibición (Coull *et al.* 2005; Prescott *et al.* 2006; Zeilhofer *et al.*, 2012) e incluso excitación (Cervero *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2012). En este sentido, nuestros resultados muestran que la administración de los agonistas inversos del receptor GABA_A-α5 y el tratamiento con el siRNA específico producen hipersensibilidad en ratas intactas (alodinia). Estos datos sugieren que los receptores GABA_A-α5 tienen una función antinociceptiva en condiciones normales, como se ha propuesto previamente (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2017). De manera interesante, está demostrado que la inhibición espinal de estos receptores en ratas intactas, por el L-655,708, aumenta la transmisión sináptica basal mediante la inducción de LTP dependiente de los receptores NMDA (Xue *et al.*, 2017). Ambos resultados concuerdan con la idea de que en condiciones normales la activación de los receptores GABA_A-α5 promueve la despolarización de la aferente primaria, lo que conduce a un efecto antinociceptivo (inhibición pre-sináptica). En condiciones patológicas de dolor (administración de reserpina), los receptores GABA_A-α5 podrían activarse tónicamente por el GABA ambiental (Farrant y Nusser, 2015) y conducir a un estado de excitabilidad tónica de las fibras aferentes primarias, reduciendo su umbral de activación y produciendo RRD, como se reportó previamente (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013). Además, este mismo fenómeno podría estar sucediendo en la medula espinal como consecuencia de la reducción de la expresión del co-transportador KCC2 (Coull *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013). Ambos procesos traerían como consecuencia la pérdida de la inhibición

GABAérgica. Nuestros datos apoyan la idea de que la reducción de la actividad de los receptores GABA_A-α5 mediante el tratamiento con agonistas inversos o el siRNA restaura la inhibición GABAérgica a nivel pre- y post-sináptico lo que resulta en la reducción de la excitabilidad de las aferentes primarias y de las neuronas de proyección y por ende, del dolor inducido por reserpina.

9.3 Los receptores GABA_A-α5 participan en la nocicepción de manera dependiente del sexo

Nuestros datos muestran que la reserpina induce conductas nociceptivas independientemente del sexo. Sin embargo, el efecto antialodínico de L-655,708 y TB21007 fue menor en los machos comparados con las hembras. Este resultado concuerda con trabajos previos, donde la administración de PAMs de los receptores GABA_A-α5 reduce los efectos del estrés (Piantadosi *et al.*, 2016) y previene el déficit locomotor inducido por anfetaminas (Batinic *et al.*, 2017) solo en ratones y ratas hembras, respectivamente. A la fecha no existen estudios contundentes que expliquen la discrepancia en la modulación nociceptiva entre machos y hembras (Mogil, 2012). Dado que los agonistas inversos del receptor GABA_A-α5 se unen al sitio de las BZ, es posible que su efecto sea distinto debido a las diferencias que existen en la unión de las BZ en distintas áreas del SNC (Shepard *et al.*, 1982; Jüptner y Hiemke, 1990) entre machos y hembras. Otros estudios sugieren que existen diferencias dependientes del sexo en la farmacocinética de varios fármacos (Czerniak, 2001). Un análisis bioinformático determinó que el promotor del gen *Gabra5* contiene elementos de respuesta a hormonas esteroides (Steiger y Russek, 2004), sugiriendo que la expresión de los receptores GABA_A-α5 puede estar regulada de manera dependiente del sexo. Finalmente, existe evidencia de que la inhibición tónica mediada por los receptores GABA_A que contienen la subunidad δ (GABA_A-δ) en la PAG se regula de manera distinta entre machos y hembras en el dolor inflamatorio crónico (Tonsfeldt *et al.*, 2016). Por lo tanto, es posible que la inhibición tónica mediada por los receptores GABA_A-α5 también esté modulada de manera diferencial entre sexos en este modelo de dolor funcional.

9.4 La expresión de la proteína de los receptores GABA_A-α5 incrementa en el modelo de fibromialgia

Los receptores GABA_A-α5 se encontraron en la parte dorsal de la médula espinal y en GRDs de ratas *naïve* y ratas tratadas con reserpina. Estos datos concuerdan con estudios previos que demuestran la expresión de la proteína en estos sitios (Bohlhalter *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2012; Loeza-Alcocer *et al.*, 2013; Lorenzo *et al.*, 2014; Bravo-Hernández *et al.*, 2014, 2016). El *western blot* muestra una banda doble en el GRD, posiblemente a que una de las variantes de la subunidad α5 que está glicosilada (Sieghart *et al.*, 1993) se expresa en esta región.

Nuestros resultados muestran que la reserpina aumentó la expresión de los receptores GABA_A-α5 tanto en médula espinal como en GRD. Estos cambios correlacionan con el aumento de las conductas nociceptivas en las ratas reserpinizadas. A nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que evalúa la expresión de los receptores GABA_A-α5 en un modelo de fibromialgia en ratas. En apoyo a nuestros datos, existe evidencia de que la expresión del ARNm de los receptores GABA_A-α5 incrementa en GRD y médula espinal en modelos de dolor neuropático (Xiao *et al.*, 2002; Yang *et al.* 2004), inflamatorio crónico (Bravo-Hernández *et al.*, 2016) y en neuronas del hipotálamo en un modelo de estrés crónico (Verkuyl *et al.*, 2004). Lo anterior sugiere que los receptores GABA_A-α5 participan en el desarrollo y el mantenimiento del dolor no adaptativo. La actividad de estos receptores podría estar alterada en estados de dolor debido a que se modulan por fosforilación (Abramian *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012). De manera interesante, la administración i.t. de L-655,708 y TB21007 revirtió la alodinia táctil y el aumento en la expresión de los receptores GABA_A-α5 en los GRD y médula espinal, sugiriendo una relación entre la expresión del receptor en sitios relacionados con el procesamiento del dolor y la presencia de conductas nociceptivas en las ratas reserpinizadas. En conjunto, nuestros datos sugieren que los receptores GABA_A-α5 tienen un papel pronociceptivo y se regulan a la alta en condiciones de dolor funcional en la rata.

9.5 La reserpina induce la activación de la microglía y los astrocitos en la médula espinal

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con reserpina incrementa la inmunorreactividad de OX-42 en el asta dorsal de la médula espinal. Esto concuerda con estudios previos donde se demostró que la reserpina y el estrés por inmersión en agua activan a la microglía, mientras que el tratamiento con minociclina suprime esta activación y disminuye la hipersensibilidad mecánica en ambos modelos de fibromialgia (Yasui *et al.*, 2014; Taguchi *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la activación de la microglía participa en el establecimiento de la sensibilización central y en la inducción y el mantenimiento del dolor inflamatorio y neuropático (Tsuda *et al.*, 2003, 2013; Suter *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2009; Inoue y Tsuda, 2009; Ellis y Bennett, 2013; Ji *et al.*, 2013a, 2013b; Koizumi *et al.*, 2013) y de estrés crónico (Orellana *et al.*, 2015; Puga *et al.*, 2015). Se sabe que la microglía activada produce y libera mediadores (factores neurotróficos, ATP, NO, glutamato) y citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, NGF, TNF- α y BDNF) que contribuyen al desarrollo de sensibilización central, favoreciendo la hiperexcitabilidad neuronal (Kawasaki *et al.*, 2008; Latremoliere y Woolf, 2009; Ji *et al.*, 2014). El BDNF secretado promueve la reducción de la expresión del co-transportador KCC2 promoviendo la acumulación del Cl⁻ intracelular en neuronas de proyección de la lámina I (Zhang *et al.*, 2013) y, por lo tanto, la inhibición GABAérgica post-sináptica disminuye (Coull *et al.*, 2005). El BDNF también regula la inhibición pre-sináptica a través de su unión al receptor TrkB, resultando en un cambio transitorio en el potencial de equilibrio y la disminución de la conductancia de los receptores GABA_A pre-sinápticos (Chen *et al.*, 2014a). Por lo tanto, la pérdida de inhibición tónica mediada por los receptores GABA_A- α 5 junto con la desinhibición pre- y post-sináptica podrían subyacer el mantenimiento de las conductas nociceptivas en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina (ver arriba).

Nuestros datos muestran que la reserpina también aumenta la inmunorreactividad de GFAP en el asta dorsal de la médula espinal. Esto contrasta con resultados obtenidos previamente donde no se observa un aumento de la señal de GFAP en este modelo de fibromialgia (Nagakura *et al.*, 2012b). No obstante, nosotros atribuimos estas discrepancias a la metodología de la tinción, los anticuerpos utilizados y al tiempo de

obtención del tejido. Al igual que la microglía, la activación de los astrocitos espinales libera citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias que contribuyen a la sensibilización central, al aumento de la transmisión sináptica excitadora y a la propagación bidireccional de señales nociceptivas en la médula espinal (Sung *et al.*, 2003; Hald, 2009; Ji *et al.*, 2013b; Ji *et al.*, 2014). Nuestros datos en el modelo de fibromialgia son similares a lo reportado en varios modelos de dolor inflamatorio y neuropático (Raghavendra *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004; Chiang *et al.*, 2005; Tanga *et al.*, 2006; Latremoliere *et al.*, 2008; Romero-Sandoval *et al.*, 2008; Okada-Ogawa *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2010) y en un modelo de estrés (Orellana *et al.*, 2015). A nuestro conocimiento, este es el primer estudio que demuestra la activación de los astrocitos en este modelo de fibromialgia, sugiriendo su contribución a la hipersensibilidad inducida por reserpina. En conjunto, nuestros datos revelan la participación de la microglía y los astrocitos en la hipersensibilidad inducida por la administración de reserpina en ratas, sugiriendo que la activación de la glía espinal juega un papel importante en estados de dolor funcional.

10. CONCLUSIONES

10.1 Conclusiones particulares

- Los receptores GABA_A-α5 espinales tienen un papel pronociceptivo dependiente del sexo en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina.
- Los receptores GABA_A-α5 espinales tienen un papel antinociceptivo en ratas intactas.
- El modelo de fibromialgia inducido por reserpina aumenta la expresión de la proteína de los receptores GABA_A-α5 en la médula espinal y en GRD.
- El modelo de fibromialgia inducido por reserpina promueve la activación de la microglía y los astrocitos en la médula espinal.

10.2 Conclusión general

Los receptores GABA_A-α5 se expresan en sitios encargados de la modulación del dolor y participan en el mantenimiento de la hipersensibilidad nociceptiva inducida por la administración de reserpina.

11. PERSPECTIVAS

Esta investigación presenta información sobre la participación de los receptores GABA_A- α 5 espinales en la hipersensibilidad del modelo de fibromialgia inducido por reserpina, que a su vez permite proponer una serie de experimentos subsecuentes para contribuir a la dilucidación de los mecanismos del dolor crónico, particularmente en este y otros modelos de dolor funcional. Entre estos experimentos destacan los siguientes:

- Determinar mediante RT-qPCR la expresión de los receptores GABA_A- α 5 después del tratamiento con el siRNA dirigido a éstos.
- Evaluar los cambios en la expresión de los receptores GABA_A- α 5 mediante otras técnicas moleculares, como RT-qPCR e inmunohistoquímica, en este y otros modelos de dolor funcional.
- Evaluar mediante herramientas farmacológicas y moleculares la participación de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 en la alodinia táctil e hiperalgesia muscular inducidas por reserpina, y en otros modelos de fibromialgia y dolor funcional.
- Utilizar la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo H para evaluar los circuitos de inhibición espinal en este y otros modelos de fibromialgia, y evaluar mediante electrofisiología las corrientes fásicas y tónicas en el dolor inducido por reserpina.
- Evaluar mediante herramientas moleculares la participación de los factores de transcripción ATF3 y ATF4 en este modelo de fibromialgia.

12. REFERENCIAS

- Abeles M., Solitar B. M., Pillinger M. H., Abeles A. M. (2008). Update on fibromyalgia therapy. *The American Journal of Medicine*, 121(7): 555-561.
- Ablin J. N., Buskila D. (2013). Fibromyalgia syndrome – Novel therapeutic targets. *Maturitas*, 75: 335-340.
- Ablin J. N., Buskila D. (2015). Update on the genetics of the fibromyalgia syndrome. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 29: 20-28.
- Abramian A. M., Comenencia-Ortiz E., Vithlani M., Tretter E. V., Sieghart W., Davies P. A., Moss S. J. (2010). Protein kinase C phosphorylation regulates membrane insertion of GABA_A receptor subtypes that mediate tonic inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53): 41795-41805.
- Akkuş S., Naziroğlu M., Eriş S., Yalman K., Yılmaz N., Yener M. (2009). Levels of lipid peroxidation, nitric oxide, and antioxidant vitamins in plasma of patients with fibromyalgia. *Cell Biochemistry and Function*, 27: 181-185.
- Alvarez P., Green P. G., Levine J. D. (2014). Role for monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the induction of chronic muscle pain in the rat. *Pain*, 155(6): 1161-1167.
- Álvarez-Leefmans F. J. (2009). Chloride transporters in presynaptic inhibition, pain and neurogenic inflammation. En Álvarez-Leefmans F. J., Delpire E. (eds.). *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System: From Molecules to Diseases*. Primera Edición, Elsevier Academic Press, pp. 439-470.
- Álvarez-Leefmans F. J., Nani A., Márquez S. (1998). Chloride transport, osmotic balance, and presynaptic inhibition. En Rudomin P., Romo R., Mendell L. M. (eds.) *Presynaptic inhibition and neural control*. Oxford University Press, New York, pp. 50-79.
- Ambriz-Tututi M., Cruz S. L., Urquiza-Marín H., Granados-Soto V. (2011). Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98(3): 417-424.
- Anderson S. D., Basbaum A. I., Fields H. L. (1977). Response of medullary raphe neurons to peripheral stimulation and to systemic opiates. *Brain Research*, 123(2): 363-368.
- Anseloni V. C., Gold M. S. (2008). Inflammation-induced shift in the valence of spinal GABA_A receptor mediated modulation of nociception in the adult rat. *Journal of Pain*, 9(8): 732-738.
- Arnold L. M., Hudson J. I., Hess E. V., Ware A. E., Fritz D. A., Auchenbach M. B., Starck L. O., Keck P. E. Jr. (2004). Family study of fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, 50(3): 944-952.

- Arora V., Chopra K. (2013). Possible involvement of oxido-nitrosative stress induced neuro-inflammatory cascade and monoaminergic pathway: Underpinning the correlation between nociceptive and depressive behavior in a rodent model. *Journal of Affective Disorders*, 151: 1041-1052.
- Arora V., Kuhad A., Tiwari V., Chopra K. (2011). Curcumin ameliorates reserpine-induced pain—depression dyad: Behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. *Psychoneuroendocrinology*, 36: 1570-1581.
- Atack J. R. (2011). GABA_A receptor subtype-selective modulators. II. α_5 -selective inverse agonists for cognition enhancement. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(9): 1203-1214.
- Baba H., Ji R. R., Kohno T., Moore K. A., Ataka T., Wakai A., Okamoto M, Woolf C. J. (2003). Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24: 818-830.
- Bäckryd E., Tanum L., Lind A., Larsson A., Gordh T. (2017). Evidence of both systemic inflammation and neuroinflammation in fibromyalgia patients, as assessed by a multiplex protein panel applied to the cerebrospinal fluid and to plasma. *Journal of Pain Research*, 10: 515-525.
- Baraniuk J. N., Whalen G., Cunningham J., Clauw D. J. (2004). Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 5: 48.
- Bardoni R., Takazawa T., Tong C.-K., Choudhury P., Scherrer G., MacDermott A. B. (2013). Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1279: 90-96.
- Basbaum A. I., Bautista D. M., Scherrer G., Julius D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2): 267-284.
- Basbaum A. I., Jessell T. M. (2000). The perception of pain. En Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. (eds). *Principles of Neuroscience*. Mc Graw-Hill, New York, pp. 472-491.
- Batinic B., Santrač A., Jančić I., Li G., Vidojević A., Marković B., Cook J. M., Savić M. M. (2017). Positive modulation of α_5 GABA_A receptors in preadolescence prevents reduced locomotor response to amphetamine in adult female but not male rats prenatally exposed to lipopolysaccharide. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 61: 31-39.
- Becker S., Schweinhardt P. (2012). Dysfunctional neurotransmitter systems in fibromyalgia, their role in central stress circuitry and pharmacological actions on these systems. *Pain Research and Treatment*, 2012: 741-746.

- Bennett R. M., Schein J., Kosinski M. R., Hewitt D. J., Jordan D. M., Rosenthal N. R. (2005). Impact of fibromyalgia pain on health-related quality of life before and after treatment with tramadol/acetaminophen. *Arthritis and Rheumatism*, 53(4): 519-527.
- Blasco-Serra A., Escríhuela-Vidal F., González-Soler E. M., Martínez-Expósito F., Blasco Ausina M. C., Martínez-Bellver S., Cervera-Ferri A. (2015). Depressive-like symptoms in a reserpine-induced model of fibromyalgia. *Physiology and Behavior*, 151: 456-462.
- Bohlhalter S., Weinmann O., Mohler H., Fristchy J. M. (1996). Laminar compartmentalization of GABA_A-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *The Journal of Neuroscience*, 16(1): 283-297.
- Bonaterra G. A., The H., Oezel L., Schwarzbach H., Matthias O., Thieme K., Di Fazio P., Kinscherf R. (2016). Morphological alterations in gastrocnemius and soleus muscles in male and female mice in a fibromyalgia model. *PLoS ONE*, 11(3): e0151116.
- Bonin R. P., Labrakakis C., Eng D. G., Whissell P. D., De Koninck Y., Orser B. A. (2011). Pharmacological enhancement of δ -subunit-containing GABA_A receptors that generate a tonic inhibitory conductance in spinal neurons attenuates acute nociception. *Pain*, 152(6): 1317-1326.
- Bonin R. P., Martin L. J., MacDonald J. F., Orser B. A. (2007). α_5 GABA_A receptors regulate the intrinsic excitability of mouse hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 98: 2244-2254.
- Bouwense S. A. W., Olesen S. S., Drewes A. M., Frøkjær J. B., van Goor H., Wilder-Smith O. H. G. (2013). Is altered central pain processing related to disease stage in chronic pancreatitis patients with pain? An exploratory study. *PLoS ONE*, 8(2): e55460.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Braudeau J., Delatour B., Duchon A., Pereira P. L., Dauphinot L., de Chaumont F., Olivo-Marin J-C., Dodd R. H., Potier M-C.(2011). Specific targeting of the GABA_A receptor α_5 subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *Journal of Psychopharmacology*, 25(8): 1030-1042.
- Bravo-Hernández M., Cervantes-Durán C., Pineda-Farías J. B., Barragán-Iglesias P., López-Sánchez P., Granados-Soto V. (2012). Role of peripheral and spinal 5-HT₃ receptors in development and maintenance of formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 101(2): 246-257.

- Bravo-Hernández M., Corleto J. A., Barragán-Iglesias P., González-Ramírez R., Pineda-Farias J. B., Felix R., Calcutt N. A., Delgado-Lezama R., Marsala M., Granados-Soto V. (2016). The α_5 subunit containing GABA_A receptors contribute to chronic pain. *Pain*, 157: 613-626.
- Bravo-Hernández M., Feria-Morales L. A., Torres-López J. E., Cervantes-Durán C., Delgado-Lezama R., Granados-Soto V., Rocha-González H. I. (2014). Evidence for the participation of peripheral α_5 subunit-containing GABA_A receptors in GABA_A agonists-induced nociception in rats. *European Journal of Pharmacology*, 734: 91-97.
- Brodin E., Ernberg M., Olgart L. (2016). Neurobiology: General considerations – from acute to chronic pain. *Den Norske Tannlegeforenings Tidende*, 126: 28-33.
- Cao J., Yang X., Liu Y., Suo Z., Shi L., Zheng C., Yang H., Li S., Hu X. (2011). GABAergic disinhibition induced pain hypersensitivity by upregulating NMDA receptor functions in spinal dorsal horn. *Neuropharmacology*, 60: 921-929.
- Carlton S., Zhou S., Coggeshall R. (1999). Peripheral GABA_A receptors: evidence for peripheral primary afferent depolarization. *Neuroscience*, 93(2): 713-722.
- Caro X. J., Winter E. F. (2014). Evidence of abnormal epidermal nerve fiber density in fibromyalgia: clinical and immunologic implications. *Arthritis and Rheumatology*, 66(7): 1945-1954.
- Casanueva B., Rodero B., Quintial C., Llorca J., González-Gay M. A. (2012). Short-term efficacy of topical capsaicin therapy in severely affected fibromyalgia patients. *Rheumatology International*, 33(10): 2665-2670.
- Castro A., Aguilar J., González-Ramírez R., Loeza-Alcocer E., Canto-Bustos M., Feliz R., Delgado-Lezama R. (2011). Tonic inhibition in spinal ventral horn interneurons mediated by α_5 subunit-containing GABA_A receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412: 26-31.
- Cervantes-Durán C., Pineda-Farias J. B., Bravo-Hernández M., Quiñonez-Bastidas G., Vidal-Cantú G. C., Barragán-Iglesias, P., Granados-Soto V. (2013). Evidence for the participation of peripheral 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, and 5-HT_{2C} receptors in formalin-induced secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Neuroscience*, 232: 169-181.
- Cervero F., Laird J. M. (1999). Visceral pain. *Lancet*, 353: 2145-2148.
- Cervero F., Laird J. M. A., García-Nicas E. (2003). Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. *European Journal of Pain*, 7: 345-351.
- Chambers M. S., Atack J. R., Broughton H. B., Collinson N., Cook S., Dawson G. R., Hobbs S. C., Marshall G., Maubach K. A., Pillai G. V., Reeve A. J., MacLeod A. M. (2003). Identification

of a novel, selective GABA_A α_5 receptor inverse agonist which enhances cognition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46: 2227-2240.

- Chaplan S. R., Bach F. W., Chung J. M., Yaksh T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *The Journal of Neuroscience Methods*, 53: 55-63.
- Chen J. T., Guo D., Campanelli D., Frattini F., Mayer F., Zhou L., Kuner R., Heppenstall P. A., Knipper M., Hu J. (2014a). Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction. *Nature Communications*, 5: 5331.
- Chen W. K., Liu I. Y., Chang Y. T., Chen Y. C., Chen C. C., Yen C. T., Shin H. S., Chen C. C. (2010). Cav3.2 T-type Ca²⁺ channel-dependent activation of ERK in paraventricular thalamus modulates acid-induced chronic muscle pain. *The Journal of Neuroscience*, 30(31): 10360-10368.
- Chen W., N., Lee C. H., Lin S. H., Wong C. W., Sun W. H., Wood J. N., Chen C. C. (2014b). Roles of ASIC3, TRPV1, and Nav1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. *Molecular Pain*, 10: 40.
- Cheng S. J., Chen C. C., Yang H. W., Chang Y. T., Bai S. W., Chen C. C., Yen C. T., Min M. Y. (2011). Role of extracellular signal-regulated kinase in synaptic transmission and plasticity of a nociceptive input on capsular central amygdaloid neurons in normal and acid-induced muscle pain mice. *The Journal of Neuroscience*, 31(6): 2258-2270.
- Chiang C. Y., Zhang S., Xie Y. F., Hu J. W., Dostrovsky J. O., Salter M. W., Sessle B. J. (2005). Endogenous ATP involvement in mustard-oil-induced central sensitization in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). *Journal of Neurophysiology*, 94(3): 1751-1760.
- Christoph T., Grünweller A., Mika J., Schäfer M. K.-H., Wade E. J., Weihe E., Erdmann V. A., Frank R., Gillen C., Kurreck J. (2006). Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350: 238-243.
- Ciampi de Andrade D., Maschietto M., Galhardoni R., Gouveia G., Chile T., Victorino-Krepischi A. C., Dale C. S., Brunoni A. R., Parravano D. C., Cueva-Moscoso A. S., Raicher I., Kazyama H. H. S., Teixeira M. J., Brentani H. P. (2017). Epigenetics insights into chronic pain: DNA hypomethylation in fibromyalgia—a controlled pilot-study. *Pain*, 0: 1-8.
- Clauw D. J. (2014). Fibromyalgia: A clinical review. *Journal of the American Medical Association*, 311(15): 1547-1555.
- Clauw D. J., Arnold L. M., McCarberg B. H. (2011). The science of fibromyalgia. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(5): 457-464.

- Collinson N., Kuenzi F. M., Jarolimek W., Maubach K. A., Cothliff R., Sur C., Smith A., Out F. M., Howell O., Atack J. R., McKernan R. M., Seabrook G. R., Dawson G. R., Whiting P. J., Rosahl T. W. (2002). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the α_5 subunit of the GABA_A receptor. *The Journal of Neuroscience*, 22(13): 5572-5580.
- Cook D. B., Lange G., Ciccone D. S., Liu W.-C., Steffener J., Natelson B. H. (2004). Functional imaging of pain in patients with primary fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 31(2): 364-378.
- Cordero M. D., Alcocer-Gómez E., Culic O., Carrión A. M., de Miguel M., Díaz-Parrado E., Pérez-Villegas E. M., Bullón P., Battino M., Sánchez-Alcazar J. A. (2014). NLRP3 inflammasome is activated in fibromyalgia: the effect of coenzyme Q₁₀. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(8): 1169-1180.
- Cordero M. D., Alcocer-Gómez E., de Miguel M., Culic O., Carrión A. M., Alvarez-Suarez J. M., Bullón P., Battino M., Fernández-Rodríguez A., Sánchez-Alcazar J. A. (2013). Can coenzyme Q₁₀ improve clinical and molecular parameters in fibromyalgia? *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(12): 1356-1361.
- Cordero M. D., Cotán D., del-Pozo-Martín Y., Carrión A. M., de Miguel M., Bullón P., Sánchez-Alcazar J. A. (2012). Oral coenzyme Q₁₀ supplementation improves clinical symptoms and recovers pathologic alterations in blood mononuclear cells in a fibromyalgia patient. *Nutrition*, 28: 1200-1203.
- Cordero M. D., Moreno-Fernández A. M., deMiguel M., Bonal P., Campa F., Jiménez-Jiménez L. M., Ruiz-Losada A., Sánchez-Domínguez B., Sánchez Alcazar J. A., Salviati L., Navas P. (2009). Coenzyme Q₁₀ distribution in blood is altered in patients with fibromyalgia. *Clinical Biochemistry*, 42: 732-735.
- Corrigan R., Derry S., Wiffen P. J., Moore R. A. (2012). Clonazepam for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012(5): CD009486.
- Costigan M., Woolf C. (2000). Pain: molecular mechanisms. *Journal of Pain*, 1: 35-44.
- Coull J. A., Beggs S., Bodreau D., Boivin D., Tsuda M., Inoue K., Gravel C., Salter M. W., De Koninck Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438: 1017-1021.
- Coull J. A., Boudreau D., Bachand K., Prescott S. A., Nault F., Sik A., De Koninck P., De Koninck Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424: 938-942.

- Covarrubias-Gómez A., Carrillo-Torres O. (2016). Actualidades conceptuales sobre fibromialgia. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 39(1): 58-63.
- Covarrubias-Gómez A., Guevara-López U., Gutiérrez-Salmerón C., Betancourt-Sandoval J. A., Córdova-Domínguez J. A. (2010). Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 33: 207-213.
- Crabtree D., Gant P. (2016). Common functional pain syndromes. *British Journal of Anesthesia Education*, 16(10): 334-340.
- Crofford L. J. (2005). The relationship of fibromyalgia to neuropathic pain syndromes. *The Journal of Rheumatology*, 75(Suppl. 75): 41-45.
- Cuatrecasas G., Alegre C., Fernandez-Solà J., Gonzales M. J., Garcia-Fructuoso F., Poca-Dias V., Nadal A., Cuatrecasas G., Navarro F., Mera A., Lage M., Peinó R., Casanueva F., Liñan C., Sesmilo G., Coves M. J., Izquierdo J. P., Alvarez I., Granados E., Puig-Domingo M. (2012). Growth hormone treatment for sustained pain reduction and improvement in quality of life in severe fibromyalgia. *Pain*, 153(7): 1382-1389.
- Czerniak R. (2001). Gender-based differences in pharmacokinetics in laboratory animal models. *International Journal of Toxicology*, 20: 161-163.
- D'Hulst C., Atack J. R., Kooy F. (2001). The complexity of the GABA_A receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discovery Today*, 14(17-18): 866-875.
- da Silva L. F. S., Walder R. Y., Davidson B. L., Wilson S. P., Sluka K. A. (2010). Changes in expression of NMDA-NR1 receptor subunits in the rostral ventromedial medulla modulates pain behaviors. *Pain*, 151(1): 155-161.
- Dai S., Ma Z. (2014). BDNF-trkB-KCC2-GABA pathway may be related to chronic stress-induced hyperalgesia at both the spinal and supraspinal level. *Medical Hypotheses*, 83: 772-774.
- de Souza A. H., da Costa A. M. L., Castro Jr. C. J., Pereira E. M. R., Peres C. K, da Silva Jr. C. A., da Silva J. F., Ferreira J., Gomez M. V. (2014). The effects of Phx1 β , a spider toxin, calcium channel blocker, in a mouse fibromyalgia model. *Toxicon*, 81: 37-42.
- de Zanette S. A., Vercelino R., Laste G., Rozisky J. R., Schwertner, Machado C. B., Xavier F., de Souza I. C. C., Deitos A., Torres I. L. S., Caumo W. (2014). Melatonin analgesia is associated with improvement of the descending endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: a phase II, randomized, double-dummy, controlled trial. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15(40).

- Delgado-Lezama R., Loeza-Alcocer E., Andrés C., Aguilar J., Guertin P. A., Felix R. (2013). Extrasynaptic GABA_A receptors in the brainstem and spinal cord: structure and function. *Current Pharmaceutical Design*, 19: 4485-97.
- Delvaux M. M. (1999). Stress and visceral perception. *Journal of Gastroenterology*, 13: 32-36.
- DeSantana J. M., da Cruz K., Sluka K. A. (2013). Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Research and Therapy*, 15: 222.
- Di Lio A., Benke D., Besson M., Desmeules J., Daali Y., Wang Z. J., Edwankar R., Cook J. M., Zeilhofer H. U. (2011). HZ166, a novel GABA_A receptor subtype-selective benzodiazepine site ligand, is antihyperalgesic in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 60(4): 626-632.
- Dina O. A., Green P. G., Levine J. D. (2008b). Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *Neuroscience*, 152(2): 521-525.
- Dina O. A., Levine J. D., Green P. G. (2008a). Muscle inflammation induces a protein kinase C epsilon-dependent chronic-latent muscle pain. *Journal of Pain*, 9(5): 457-462.
- Dina O. A., Levine J. D., Green P. G. (2011). Enhanced cytokine-induced mechanical hyperalgesia in skeletal muscle produced by a novel mechanism in rats exposed to unpredictable sound stress. *European Journal of Pain*, 15(8): 796-800.
- Dirig D. M., Yaksh T. L. (1995). Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275(1): 219-227.
- Dixon W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20: 441-462.
- Doppler K., Rittner H. L., Deckart M., Sommer C. (2015). Reduced dermal nerve fiber diameter in skin biopsies of patients with fibromyalgia. *Pain*, 156(11): 2319-2325.
- Doré-Savard L., Roussy G., Dansereau M.-A., Collingwood M. A., Lennox K. A., Rose S. D., Beaudet N., Behlke M., Sarret P. (2008). Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research. *Molecular Therapy*, 16(7): 1331-1339.
- Dorn G., Patel S., Wotherspoon G., Hemmings-Mieszczak M., Barclay J., Natt F. J. C., Martin P., Bevan S., Fox A., Ganju P., Wishart W., Hall J. (2004). siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Research*, 32(5): e49.
- Doyon N., Prescott S., Castonguay A., Godin A., Kröger H., De Koninck Y. (2011). Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. *PLoS Computational Biology*, 7(9): e1002149.

- Dubin A. E., Patapoutian A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11): 3760-3772.
- Ebert B., Thompson S. A., Saounatsou K., McKernan R., Krogsgaard-Larsen P., Wafford K. A. (1997). Differences in agonist/antagonist binding affinity and receptor transduction using recombinant human γ -aminobutyric acid type A receptors. *Molecular Pharmacology*, 52(6): 1150-1156.
- Egloff N., Cámara R. J. A., von Känel R., Klingler N., Marti E., Ferrari M. G. (2014). Hypersensitivity and hyperalgesia in somatoform pain disorders. *General Hospital Psychiatry*, 36: 284-290.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411: 494-498.
- Elbashir S. M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26: 199-213.
- Ellis A., Bennett D. L. (2013). Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia*, 111(1): 26-37.
- Farrant M., Nusser Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 6: 215-226.
- Farré M., Farré A., Fiz J., Torrens M. (2017). Cannabis use in fibromyalgia. En Preedy V. (ed). *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis and Treatment*. First Edition, Elsevier Inc., pp. 158-167.
- Favero G., Trapletti V., Bonomini F., Stacchiotti A., Lavazza A., Rodella L. F., Rezzani R. (2017). Oral supplementation of melatonin protects against fibromyalgia-related skeletal muscle alterations in reserpine-induced myalgia rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7): 1389.
- Ferrari L. F., Bogen O., Levine J. D. (2013). Role of nociceptor α CaMKII in transition from acute to chronic pain (hyperalgesic priming) in male and female rats. *The Journal of Neuroscience*, 33(27): 11002-11011.
- Ferrari L. F., Lotufo C. M., Araldi D., Rodrigues M. A., Macedo L. P., Ferreira S. H., Parada C. A. (2014). Inflammatory sensitization of nociceptors depends on NMDA receptors in DRG satellite cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51: 18363-18368.

- Fields H. L., Anderson S. D., Clanton C. H., Basbaum A. I. (1976). Nucleus raphe magnus: a common mediator of opiate- and stimulus- produced analgesia. *Transactions of the American Neurological Association Journal*, 101: 208-210.
- Fields H. L., Basbaum A. I., Clanton C. H., Anderson S. D. (1977). Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Research*, 126(3): 441-453.
- Gandhi R., Ryals J. M., Wright D. E. (2004). Neurotrophin-3 reverses chronic mechanical hyperalgesia induced by intramuscular acid injection. *Neuroscience*, 24(42): 9405-9413.
- García de Lucas A., Ahring P. K., Larsen J. S., Rivera-Arconada I., López-García J. A., Mirza N. R., Munro G. (2015). GABA_A α_5 subunit-containing receptors do not contribute to reversal of inflammatory-induced spinal sensitization as indicated by the unique selectivity profile of the GABA_A receptor allosteric modulator NS16085. *Biochemical Pharmacology*, 93: 370-379.
- García-Nicas E., Laird J. M., Cervero F. (2001). Vasodilatation in hyperalgesic rat skin evoked by stimulation of afferent A beta-fibers: further evidence for a role of dorsal root reflexes in allodynia. *Pain*, 94: 283-291.
- García-Nicas E., Laird J. M., Cervero F. (2006). GABA_A-receptor blockade reverses the injury-induced sensitization of nociceptor-specific (NS) neurons in the spinal dorsal horn of the rat. *Journal of Neurophysiology*, 96: 661-670.
- Geenen R., Jacobs J. W., Bijlsma J. W. (2002). Evaluation and management of endocrine dysfunction in fibromyalgia. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 28(2): 389-404.
- Geisser M. E., Glass J. M., Rajcevska L. D., Clauw D. J., Williams D. A., Kileny P. R., Gracely R. H. (2008). A psychophysical study of auditory and pressure sensitivity in patients with fibromyalgia and healthy controls. *Journal of Pain*, 9(5): 417-422.
- Godínez-Chaparro B., López-Santillán F. J., Orduña P., Granados-Soto V. (2012). Secondary mechanical allodynia and hyperalgesia depend on descending facilitation mediated by spinal 5-HT₄, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors. *Neuroscience*, 222: 379-391.
- Gold M. S., Gebhart G. F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*, 16(11): 1248-1257.
- Goldberg D. S., McGee S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11:770.
- Gosselin R.-D., Suter M. R., Ji R.-R., Decosterd I. (2010). Glial cells and chronic pain. *The Neuroscientist*, 16(5): 519-531.

- Gracely R. H., Petzke F., Wolf J. M., Clauw D. J. (2002). Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, 46(5): 1333-1343.
- Granados-Soto V., Argüelles C. F., Álvarez-Leefmans F. (2005). Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter blockers on formalin-induced nociception in rats. *Pain*, 114: 231-238.
- Graven-Nielsen T., Aspegren Kendall S., Henriksson K. G., Bengtsson M., Sörensen J., Johnson A., Gerdle B., Arendt-Nielsen L. (2000). Ketamine reduces muscle pain, temporal summation, and referred pain in fibromyalgia patients. *Pain*, 85(3): 483-491.
- Green P. G., Alvarez P., Gear R. W., Mendoza D., Levine J. D. (2011). Further validation of a model of fibromyalgia syndrome in rat. *Journal of Pain*, 12(7): 811-818.
- Gregory N. S., Brito R. G., Fusaro M. C., Sluka K. A. (2016). ASIC3 is required for development of fatigue-induced hyperalgesia. *Molecular Neurobiology*, 53(2): 1020-1030.
- Gregory N. S., Gibson-Corley K., Frey-Law L., Sluka K. A. (2013). Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. *Pain*, 154(12): 2668-2676.
- Guan Z., Kuhn J. A., Wang X., Colquitt B., Solorzano C., Vaman S., Guan A. K., Evans-Reinsch Z., Braz J., Devor M., Abboud-Werner S. L., Lanier L. L., Lomvardas S., Basbaum A. I. (2016). Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nature Neuroscience*, 19(1): 94-101.
- Guevara C., Fernandez A. C., Cardenas R., Suarez-Roca H. (2015). Reduction of spinal PGE₂ concentrations prevents swim stress-induced thermal hyperalgesia. *Neuroscience Letters*, 591: 110-114.
- Guo D., Hu J. (2014). Spinal presynaptic inhibition in pain control. *Neuroscience*, 283: 95-106.
- Guo W., Robbins M. T., Wei F., Zou S., Dubner R., Ren K. (2006). Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. *The Journal of Neuroscience*, 26(1): 126-137.
- Hald A. (2009). Spinal astrogliosis in pain models: cause and effects. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(5): 609-619.
- Hammond D. L., Drower E. J. (1984). Effects of intrathecally administered THIP, baclofen and muscimol on nociceptive threshold. *European Journal of Pharmacology*, 103(1-2): 121-125.

- Hammond D.L. (1997). Inhibitory neurotransmitters and nociception: role of GABA and glycine. En Dickenson A. H. y Besson J. M. (eds). *The Pharmacology of Pain*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 361-384.
- Hansen R. R., Erichsen H. K., Brown D. T., Mirza N. R., Munro G. (2012). Positive allosteric modulation of GABA_A receptors reduces capsaicin-induced primary and secondary hypersensitivity in rats. *Neuropharmacology*, 63(8): 1360-1367.
- Harris R. E. (2010). Elevated excitatory neurotransmitter levels in the fibromyalgia brain. *Arthritis Research and Therapy*, 12(5): 141.
- Harris R. E., Clauw D. J., Scott D. J., McLean S. A., Gracely R. H., Zubieta J. K. (2007). Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *The Journal of Neuroscience*, 27(37): 10000-10006.
- Harris R. E., Napadow V., Huggins J. P., Pauer L., Kim J., Hampson J., Sundgren P. C., Foerster B., Petrou M., Schmidt-Wilcke T., Clauw D. J. (2013). Pregabalin rectifies aberrant brain chemistry, connectivity, and functional response in chronic pain patients. *Anesthesiology*, 119(6): 1453-1464.
- Harris R. E., Sundgren P. C., Craig A. D., Kirshenbaum E., Sen A., Napadow V., Clauw D. J. (2009). Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain. *Arthritis and Rheumatism* 60(10): 3146-3152.
- Hata T., Itoh E., Kawabata A. (1991). Changes in CNS levels of serotonin and its metabolite in SART-stressed (repeatedly cold-stressed) rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 56(1): 101-104.
- Heinricher M. M., Tavares I., Leith J. L., Lumb B. M. (2009). Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Behavioural Brain Research*, 195(1): 214-225.
- Henningsen P., Zipfel S., Herzog W. (2007). Management of functional somatic syndromes. *Lancet*, 369: 946-955.
- Hernandez-Leon A., De la Luz-Cuellar Y. E., Granados-Soto V., González-Trujano M. E., Fernández-Guasti A. (2017). Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. *Hormones and Behavior*, 97: 39-46.
- Hoeger-Bement M. K., Sluka K. (2003). Phosphorylation of CREB and mechanical hyperalgesia is reversed by blockade of the cAMP pathway in a time-dependent manner after repeated intramuscular acid injections. *The Journal of Neuroscience*, 23(13): 5437-5445.
- Holton K. F., Taren D. L., Thomson C. A., Bennett R. M., Jones K. D. (2012). The effect of dietary glutamate on fibromyalgia and irritable bowel symptoms. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 30(6, Suppl. 74): 10-17.

- Hossaini M., Goos J. A. C., Kohli S. K., Holstege J. C. (2012). Distribution of glycine/GABA neurons in the ventromedial medulla with descending spinal projections and evidence for an ascending glycine/GABA projection. *PLoS ONE*, 7(4): e35293.
- Imbe H., Kimura A., Donishi T., Kaneoke Y. (2014). Repeated forced swim stress enhances CFA-evoked thermal hyperalgesia and affects the expressions of pCREB and c-Fos in the insular cortex. *Neuroscience*, 259: 1-11.
- Inoue K., Tsuda M. (2009). Microglia and neuropathic pain. *Glia*, 57: 1469-1479.
- Jacob T. C., Moss S. J., Jurd R. (2008). GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(5): 331-343.
- Jarrett M. E., Shulman R. J., Cain K. C., Deechakawan W., Smith L. T., Richebé P., Eugenio M., Heitkemper M. M. (2014). Conditioned pain modulation in women with irritable bowel syndrome. *Biological Research for Nursing*, 16(4): 368-377.
- Jensen K. B., Kosek E., Petzke F., Carville S., Fransson P., Marcus H., Williams S. C. R., Choy E., Giesecke T., Mainguy Y., Gracely R., Ingvar M. (2009). Evidence of dysfunctional pain inhibition in fibromyalgia reflected in rACC during provoked pain. *Pain*, 144: 95-100.
- Jeschonnek M., Grohmann G., Hein G., Sprott H. (2000). Abnormal microcirculation and temperature in skin above tender points in patients with fibromyalgia. *Rheumatology*, 39: 917-921.
- Ji K., Miyauchi J., Tsirka S. E. (2013a). Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural Plasticity*, 2013: 1-9.
- Ji Q., Di Y., He X., Liu Q., Liu J., Li W., Zhang L. (2016). Intrathecal injection of phosphodiesterase 4B-specific siRNA attenuates neuropathic pain in rats with L5 spinal nerve ligation. *Molecular Medicine Reports*, 13: 1914-1922.
- Ji R. R., Berta T., Nedergaard M. (2013b). Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 154: S10-28.
- Ji R. R., Xu Z. Z., Gao Y. J. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7): 533-548.
- John J. M., Kaneko M., Hammond D. L. (1998). Intrathecal bicuculline does not increase formalin-induced inflammation. *Brain Research*, 794: 320-324.
- Jones K. D., Deodhar P., Lorentzen A., Bennett R. M., Deodhar A. A. (2007). Growth hormone perturbations in fibromyalgia: a review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 36(6): 357-379.
- Joseph E. K., Levine J. D. (2010). Hyperalgesic priming is restricted to isolectin B4-positive nociceptors. *Neuroscience*, 169(1): 431-435.

- Julius D., Basbaum A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210.
- Jüptner M., Hiemke C. (1990). Sex differences in GABA_A receptor binding in rat brain measured by an improved *in vitro* binding assay. *Experimental Brain Research*, 81: 297-302.
- Kahle K. T., Staley K. J., Nahed B. V., Gamba G., Hebert S. C., Lifton R. P., Mount D. B. (2008). Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(9): 490-503.
- Kaneko K., Umehara M., Homan T., Okamoto K., Oka M., Oyama T. (2014). The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. *Neuroscience Letters*, 562: 28-33.
- Kato G., Yasaka T., Katafuchi T., Furue H., Mizuno M., Iwamoto Y., Yoshimura M. (2006). Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by *in vivo* patch-clamp analysis in rats. *The Journal of Neuroscience*, 26(6): 1787-1794.
- Kawasaki Y., Zhang L., Cheng J. K., Ji R. R. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: Distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 28: 5189-5194.
- Keller A. F., Beggs S., Salter M. W., Koninck D. (2007). Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Molecular Pain*, 3: 27.
- Khasar S. G., Dina O. A., Green P. G., Levine J. D. (2009). Sound stress-induced long term enhancement of mechanical hyperalgesia in skeletal muscle produced by a novel mechanism in rats exposed to unpredictable sound stress. *Journal of Pain*, 10(10): 1073-1077.
- Kim J. Y., Tillu D. V., Quinn T. L., Mejia G. L., Asiedu M. N., Murad E., Schumann A. P., Totsch S. K., Sorge R. E., Mantyh P. W., Dussor G., Price T. J. (2015). Spinal dopaminergic projections control the transition to pathological pain plasticity via a D1/D5-mediated mechanism. *The Journal of Neuroscience*, 35(16): 6307-6317.
- Kim S. H., Song J., Mun H., Park K. U. (2009). Effect of the combined use of tramadol and minalcipran on pain threshold in an animal model of fibromyalgia. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 24(2): 139-142.
- Klein C. P., Cintra M. R., Binda N., Diniz D. M., Gomez M. V., Souto A. A., de Souza A. H. (2016). Coadministration of resveratrol and rice oil mitigates nociception and oxidative state in a mouse fibromyalgia-like model. *Pain Research and Treatment*, 2016: 3191638.

- Klein C. P., Sperotto N. D., Maciel I. S., Leite C. E., de Souza A. H., Campos M. M. (2014). Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. *Neuropharmacology*, 86: 57-66.
- Knabl J., Witschi R., Hösl K., Reinold H., Zeilhofer U. B., Ahmadi S., Brockhaus J., Sergejeva M., Hess A., Brune K., Fritschy J-M., Rudolph U, Möhler H., Zeilhofer H. U. (2008). Reversal of pathological pain through specific spinal GABA_A receptors subtypes. *Nature Letters*, 415(17): 330-335.
- Ko G. D., Hum A., Traitses G., Berbrayer D. (2007). Effects of topical O24 essential oil on patients with fibromyalgia syndrome: a randomized placebo controlled pilot study. *Journal of Musculoskeletal Pain*, 15(1): 11-19.
- Koizumi S., Ohsawa K., Inoue K., Kohsaka S. (2013). Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia*, 61(1): 47-54.
- Kosek E., Altawil R., Kadetoff D., Finn A., Westman M., Le Maitre E., Andersson M., Jensen-Urstad M., Lampa J. (2015). Evidence of different mediators of central inflammation in dysfunctional and inflammatory pain – Interleukin-8 in fibromyalgia and interleukin-1 β in rheumatoid arthritis. *Journal of Neuroimmunology*, 280: 49-55.
- Kulkarni S. K. (1980). Heat and other physiological stress-induced analgesia: catecholamine mediated and naloxone reversible response. *Life Sciences*, 27: 185.
- Kulkarni S. K., Robert R. K. (1982). Reversal by serotonergic agents of reserpine-induced hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, 83: 325-328.
- Laird J., García-Nicas E., Delpire E., Cervero F. (2004). Presynaptic inhibition and spinal pain processing in mice: a possible role of the NKCC1 cation-chloride co-transporter in hyperalgesia. *Neuroscience Letters*, 361: 200-203.
- Larson A., Giovengo S. L., Russell I. J., Michalek J. E. (2000). Changes in the concentrations of amino acids in the cerebrospinal fluid that correlate with pain in patients with fibromyalgia: implications for nitric oxide pathways. *Pain*, 87: 201-211.
- Latremoliere A., Mauborgne A., Masso J., Burogoin S., Kayser V., Hamon M., Pohl M. (2008). Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *The Journal of Neuroscience*, 28(34): 8489-8501.
- Latremoliere A., Woolf C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *Journal of Pain*, 10(9): 895-926.
- Lee I. O., Lim E. S. (2010). Intracisternal or intratecal glycine, taurine, or muscimol inhibit bicuculline-induced allodynia and thermal hyperalgesia in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(8): 907-914.

- Levine J. D., Reichling D. B. (1999). Peripheral mechanisms of inflammatory pain. En Wall P. D., Melzack R. (eds). *Textbook of Pain*. 4th edition, Edinburg Churchill, Livingstone, pp. 59-84.
- Lin C. C., Chen W. N., Chen C. J., Lin Y. W., Zimmer A., Chen C. C. (2012). An antinociceptive role for substance P in acid-induced chronic muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2): 76-83.
- Lin J.-G., Hsieh C.-L., Lin Y.-W. (2015). Analgesic effect of electroacupuncture in a mouse fibromyalgia model: roles of TRPV1, TRPV4, and ERK. *PLoS ONE*, 10(6): e0128037.
- Linhart O., Obreja O., Kress M. (2003). The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E₂ and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience*, 118: 69-74.
- Lister R. E. (2002). An open, pilot study to evaluate the potential benefits of coenzyme Q10 combined with Ginko biloba extract in fibromyalgia syndrome. *Journal of International Medical Research*, 30(2): 195-199.
- Liu S. B., Zhao R., Li X. S., Guo H. J., Tian Z., Zhang N., Gao G. D., Zhao M. G. (2014a). Attenuation of reserpine-induced pain/depression dyad by gentiopicroside through downregulation of GluN2B receptors in the amygdala of mice. *Neuromolecular Medicine*, 16(2): 350-359.
- Liu Y. T., Shao Y. W., Yen C. T., Shaw F. Z. (2014b). Acid-induced hyperalgesia and anxiety-depressive comorbidity in rats. *Physiology and Behavior*, 131: 105-110.
- Loeza-Alcocer E., Canto-Bustos M., Aguilar J., González-Ramírez R., Felix R., Delgado-Lezama R. (2013). α_5 GABA_A receptors mediate primary afferent fiber tonic excitability in the turtle spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 110: 2175-2184.
- López-Solà M., Woo C. W., Pujol J., Deus J., Harrison B. J., Monfort J., Wager T. D. (2017). Towards a neurophysiological signature for fibromyalgia. *Pain*, 158: 34-47.
- Lorenzo L. E., Godin A. G., Wang F., St-Louis M., Carbonetto S., Wiseman P. W., Ribeiro-da-Silva A., De Koninck Y. (2014). Gephyrin clusters are absent from small diameter primary afferent terminals despite the presence of GABA_A receptors. *The Journal of Neuroscience*, 34(24): 8300-8317.
- Lu K. W., Hsieh C. L., Yang J., Lin Y. W. (2017). Effects of electroacupuncture in a mouse model of fibromyalgia: role of N-methyl-D-aspartate receptors and related mechanisms. *Acupuncture in Medicine*, 35(1): 59-68.
- Lukaczer D., Darland G., Tripp M., Liska D., Lerman R. H., Schiltz B., Bland J. S. (2005). A pilot trial evaluating Meta050, a proprietary combination of reduced iso-alpha acids, rosemary extract and oleanolic acid in patients with arthritis and fibromyalgia. *Phytotherapy Research*, 19(10): 864-869.

- Lund N., Bengtsson A., Thorborg P. (1986). Muscle tissue oxygen pressure in primary fibromyalgia. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 15: 165-173.
- Macdonald R. L., Botzolakis E. J. (2009). GABA_A receptor channels. En Álvarez-Leefmans F. J., Delpire E. (eds.). *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System: From Molecules to Diseases*. Primera Edición, Elsevier Academic Press, pp. 257-271.
- Malan T. P., Mata H. P., Porreca F. (2002). Spinal GABA_A and GABA_B receptor pharmacology in a rat model of neurophatic pain. *Anesthesiology*, 96: 1161-1167.
- Mandela P., Chandley M., Xu Y-Y., Zhu M-Y., Ordway G. A. (2010). Reserpine-induced reduction in norepinephrine transporter function requires catecholamine storage vesicles. *Neurochemistry International*, 56(6-7): 760-767.
- Martin L. J., Bonin R. P., Orser B. A. (2009). The physiological properties and therapeutic potential of α_5 -GABA_A receptors. *Biochemical Society Transactions*, 37(6): 1334-1337.
- Mayer E. A., Bushnell M. C. (2009). Functional pain disorders: time for a paradigm shift? En: *Functional pain syndromes: presentation and pathophysiology*. IASP Press, 531-565.
- McCabe C., Shaw D., Atack J. R., Street J. L., Wafford K. A., Dawson G. R., Reynolds D. S., Leslie J. C. (2004). Subtype-selective GABAergic drugs facilitate extinction of mouse operant behavior. *Neuropharmacology*, 46: 171-178.
- McCarty D. J., Csuka M., McCarthy G., Trotter D. (1994). Treatment of pain due to fibromyalgia with topical capsaicin: a pilot study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 23(Suppl. 3): 41-47.
- McKay P. F., Foster K. L., Mason D., Cummings R., Garcia M., Williams L. S., Grey C., McCane S., He X., Cook J. M., June H. L. (2004). A high affinity ligand for GABA_A-receptor containing α_5 subunit antagonizes ethanol's neurobehavioral effects in Long-Evans rats. *Psychopharmacology*, 172(4): 455-462.
- Meeus M., Hermans L., Ickmans K., Struyf F., Van Cauwenbergh D., Bronckaerts L., De Clerck L. S., Moorken G., Hans G., Grosemans S., Nijs J. (2015). Endogenous pain modulation in response to exercise in patients with rheumatoid arthritis, patients with chronic fatigue syndrome and comorbid fibromyalgia, and healthy controls: a double-blind randomized controlled trial. *Pain Practice*, 15(2): 98-106.
- Melzack R., Wall P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150: 971-979.
- Mendez M. A., Horder J., Myers J., Coghlan S., Stokes P., Erritzoe D., Howes O., Lingford-Hughes A., Murphy D., Nutt D. (2013). The brain GABA-benzodiazepine receptor α_5 subtype

in autism spectrum disorder: a pilot [(11)C]Ro15-4513 positron emission tomography study. *Neuropharmacology*, 68: 195-201.

- Mendieta D., De la Cruz-Aguilera D. L., Barrera-Villalpando M. I., Becerril-Villanueva E., Arreola R., Hernández-Ferreira E., Pérez-Tapia S. M., Pérez-Sánchez G., Garcés-Alvarez M. E., Aguirre-Cruz L., Velasco-Velázquez M. A., Pavón L. (2016). IL-8 and IL-6 primarily mediate the inflammatory response in fibromyalgia patients. *Journal of Neuroimmunology*, 290: 22-25.
- Merskey H. (1994). Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Second Edition. Monograph of IASP Task Force on Taxonomy 1994, International Association for the Study of Pain.
- Millić M., Timić T., Joksimović S., Biawat P., Rallapalli S., Divljaković J., Radulović T., Cook J. M., Savić M. M. (2013). PWZ-029, an inverse agonist selective for α_5 GABA_A receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behavioral Brain Research*, 241: 206-213.
- Mitchell E. A., Gentet L. J., Dempster J., Belelli D. (2007). GABA_A and glycine receptor-mediated transmission in rat lamina II neurons: relevance to the analgesic actions of neuroactive steroids. *Journal of Physiology*, 583(3): 1021-1040.
- Mizumura K. (2009). Peripheral mechanism of muscle pain: An update. *Current Anaesthesia and Critical Care*, 20: 183-187.
- Mogil J. S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(12): 859-866.
- Möhler H., Fritschy J. M., Rudolph U. (2002). A new benzodiazepine pharmacology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1): 2-8.
- Montserrat-de la Paz S., García-Giménez M. D., Ángel-Martín M., Fernández-Arche A. (2015). Validation and additional support for an experimental animal model of fibromyalgia. *Modern Rheumatology*, 25(1): 116-122.
- Moore K. A., Kohno T., Karchwski L. A., Scholz J., Baba H., Woolf C. J. (2002). Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 22(15): 6724-6731.
- Müller F., Heinke B., Sandkühler J. (2003). Reduction of glycine receptors-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience*, 122: 799-805.
- Munro G., Erichsen H. K., Rae M. G., Mirza N. R. (2011). A question of balance--positive versus negative allosteric modulation of GABA_A receptor subtypes as a driver of analgesic efficacy in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 61(1-2): 121-132.

- Munro G., López-García J. A., Rivera-Arconada I., Erichsen H. K., Nielsen E. Ø., Larsen J. S., Ahring P. K., Mirza N. R. (2008). Comparison of the novel subtype-selective GABA_A receptor-positive allosteric modulator NS11394 [3'-[5-(hydroxyl-1-methyl-ethyl)-benzoimidazol-1-yl]-biphenyl-2-carbonitrile] with diazepam, zolpidem, bretanezil, and gabodaxol in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(3): 969-981.
- Murai N., Fushiki H., Honda S., Murakami Y., Iwashita A., Irie M., Tamura S., Nagakura Y., Aoki T. (2015). Relationship between serotonin transporter occupancies and analgesic effects of AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, and duloxetine in reserpine-induced myalgia rats. *Neuroscience*, 289: 262-269.
- Nagakura Y. (2015). Challenges in drug discovery for overcoming 'dysfunctional pain': an emerging category of chronic pain. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(10): 1043-1045.
- Nagakura Y., Ito H., Shimizu Y. (2012a). Animal models of fibromyalgia. New Insights of Fibromyalgia, William S. Wilke (ed.), InTech, pp. 41-57.
- Nagakura Y., Oe T., Aoki T., Matsuoka N. (2009). Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain*, 146: 26-33.
- Nagakura Y., Takahashi M., Noto T., Sekizawa T., Oe T., Yoshimi E., Tamaki K., Shimizu Y. (2012b). Different pathophysiology underlying animal models of fibromyalgia and neuropathic pain: Comparison of reserpine-induced myalgia and chronic constriction injury rats. *Behavioural Brain Research*, 226: 242-249.
- Naono-Nakayama R., Sunakawa N., Ikeda T., Nishimori T. (2011). Knockdown of the tachykinin neurokinin 1 receptor by intrathecal administration of small interfering RNA in rats. *European Journal of Pharmacology*, 670: 448-457.
- Nazeri M., Zarei M.-R., Pourzare A.-R., Ghahregh-Chahi H.-R., Abareghi F., Shabani M. (2017). Evidence of altered trigeminal nociception in an animal model of fibromyalgia. *Pain Medicine* (article in press).
- Neeck G. (2000). Neuroendocrine and hormonal perturbations and relations to the serotonergic system in fibromyalgia patients. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 113: 8-12.
- Nickolls S., Mace H. Fish R., Edye M., Gurrell R., Ivarsson M., Pitcher T., Tanimoto-Mori S., Richardson D., Sweatman C., Nicholson J., Ward C., Jinks J., Bell C., Young K., Rees H., Moss A., Kinloch R., McMurray G. (2011). A comparison of the $\alpha_{2/3/5}$ selective positive allosteric modulators L-838,417 and TPA023 in preclinical models of inflammatory and neuropathic pain. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2011: 1-12.

- Nishiyori M., Nagai J., Nakazawa T., Ueda K. (2010). Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Neuroscience Letters*, 472: 184-187.
- Nishiyori M., Uchida H., Nagai J., Araki K., Mukae T., Kishioka S., Ueda H. (2011). Permanent relief from intermittent cold stress-induced fibromyalgia-like abnormal pain by repeated intrathecal administration of antidepressants. *Molecular Pain*, 7: 69.
- Nishiyori M., Ueda H. (2008). Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Molecular Pain*, 4: 52.
- Njoo C., Heintz C., Kuner R. (2014). *In vivo* siRNA transfection and gene knockdown in spinal cord via rapid noninvasive lumbar intrathecal injections in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 85: e51229.
- Oaklander A. L., Herzog Z. D., Downs H. M., Klein M. M. (2013). Objective evidence that small-fiber polyneuropathy underlies some illnesses currently labeled as fibromyalgia. *Pain*, 154(11): 2310-2316.
- Oe T., Tsukamoto Y., Nagakura Y. (2010). Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. *Neuroscience*, 169: 1860-1871.
- Oghidani M., Kato T. A., Hosoi M., Tsuda M., Hayakawa K., Hayaki C., Iwaki R., Sagata N., Hashimoto R., Inoue K., Sudo N., Kanba S. (2017). Fibromyalgia and microglial TNF- α : Translational research using human blood induced microglia-like cells. *Nature Scientific Reports*, 7: 11882.
- Ogino S., Nagakura Y., Tsukamoto M., Watabiki T., Ozawa T., Oe T., Shimizu Y., Ito H. (2013). Systemic administration of 5-HT_{2C} receptor agonists attenuates muscular hyperalgesia in reserpine-induced myalgia model. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 108: 8-15.
- Okada-Ogawa A., Susuki I., Sessle B. J., Chiang C. Y., Salter M. W., Dostrovsky J. O., Tsuboi Y., Kondo M., Kitagawa J., Kobayashi A., Noma N., Imamura Y., Iwata K. (2009). Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 29(36): 11161-11171.
- Okano K., Kuraishi Y., Satoh M. (1995). Effects of intrathecally injected glutamate and Substance P antagonists on repeated cold stress-induced hyperalgesia in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(1): 42-44.
- Oktayoglu P., Tahtasiz M., Bozkurt M., Em S., Ucar D., Yazmalar L., Mete N., Nas K., Gezer O. (2013). Serum levels of high mobility group box 1 protein and its association with quality of

life and psychological and functional status in patients with fibromyalgia. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 16: 403-407.

- Oliveira L. R., de Melo V. U., Macedo F. N., Barreto A. S., Badaue-Passos D. Jr., Viana dos Santos M. R., Dias D. P., Sluka K. A., DeSantana J. M., Santana-Filho V. J. (2012). Induction of chronic non-inflammatory widespread pain increases cardiac sympathetic modulation in rats. *Autonomic Neuroscience*, 167(1-2): 45-49.
- Olsen R. W., Sieghart W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology and function. *Pharmacological Reviews*, 60(3): 243-260.
- Olsen R. W., Sieghart W. (2009). GABA_A receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56: 141-148.
- Omiya Y., Goto K., Ishige A., Komatsu Y. (2000). Changes in analgesia-producing mechanism of repeated cold stress loading mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 65(2): 261-266.
- Orellana J. A., Moraga-Amaro R., Díaz-Galarce R., Rojas S., Maturana C. J., Stehberg J., Sáez J. C. (2015). Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9: 102.
- Ossipov M. H., Dussor G. O., Porreca F. (2010). Central modulation of pain. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11): 3779-3787.
- Ossipov M. H., Morimura K., Porreca F. (2014). Descending pain modulation and chronification of pain. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 8(2): 143-151.
- Parada C. A., Reichling D. B., Levine J. D. (2005). Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKC epsilon second messenger pathways. *Pain*, 113(1-2): 185-190.
- Pasqual Marques A., de Sousa do Espírito Santo A., Assumpção Berssaneti A., Akemi Matsutani L., King Yuan S. L. (2017). Prevalence of fibromyalgia: literature review update. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 57(4): 356-363.
- Paul J., Zeilhofer H. U., Fritschy J. M. (2012). Selective distribution of GABA_A receptor subtypes in mouse spinal dorsal horn neurons and primary afferents. *Journal of Comparative Neurology*, 520: 3895-3891.
- Perez-Sanchez J., Lorenzo L-E., Lecker I., Zurek A. A., Labrakakis C., Bridgwater E. M., Orser B. A., De Koninck Y., Bonin R. P. (2017). α_5 GABA_A receptors mediate tonic inhibition in the spinal cord dorsal horn and contribute to the resolution of hyperalgesia. *Journal of Neuroscience Research*, 95: 1307-1318.

- Pertovaara A., Almeida A. (2006). Chapter 13: Descending Inhibitory Systems. En Cervero F., Jensen T. S. (eds). *Handbook of Clinical Neurology*, 81: 179-192.
- Petzke F., Clauw D. J., Ambrose K., Khine A., Gracely R. H. (2003). Increased pain sensitivity in fibromyalgia: effects of stimulus type and mode of presentation. *Pain*, 105(3): 403-413.
- Petzke F., Khine A., Williams D., Groner K., Clauw D. J., Gracely R. H. (2001). Dolorimetry performed at 3 pair tender points highly predicts overall tenderness. *Journal of Rheumatology*, 28(11): 2568-2569.
- Piantadosi S. C., French B. J., Poe M. M., Timić T., Marković B. D., Pabba M., Seney M. L., Oh H., Orser B. A., Savić M. M., Cook J. M., Sibille E. (2016). Sex-dependent anti-stress effect of an α_5 subunit containing GABA_A receptor positive allosteric modulator. *Frontiers in Pharmacology*, 7: 446.
- Pratt D., Fuchs P. N., Sluka K. A. (2013). Assessment of avoidance behaviors in mouse models of muscle pain. *Neuroscience*, 248: 54-60.
- Prescott S. A., Sejnowski T. J., De Koninck Y. (2006). Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons: towards a biophysical basis for neuropathic pain. *Molecular Pain*, 2: 32.
- Price T. J., Cervero F., Gold, M. Hammond, D. Prescott, S. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Research Reviews*, 60: 149-170.
- Price T. J., Hargreaves K. M., Cervero F. (2006). Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Research*, 1112: 146-158.
- Price T. J., Prescott S. A. (2015). Inhibitory regulation of the pain gate and how its failure causes pathological pain. *Pain*, 156: 789-792.
- Puga D. A., Tovar C. A., Guan Z., Gensel J. C., Lyman M. S., McTigue D. M., Popovich P. G. (2015). Stress exacerbates neuron loss and microglia proliferation in a rat model of excitotoxic lower motor neuron injury. *Brain, Behavior, and Immunity*, 49: 246-254.
- Qin M., Wang J. J., Cao R., Zhang H., Duan L., Gao B., Xiong Y. F., Chen L. W., Rao Z. R. (2006). The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Neuroscience Research*, 55(4): 442-450.
- Queiroz L. P. (2013). Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Current Pain and Headache Reports*, 17(8): 356.

- Quintero L., Cárdenas R., Suarez-Roca H. (2011). Stress-induced hyperalgesia is associated with a reduced and delayed GABA inhibitory control that enhances post-synaptic NMDA receptor activation in the spinal cord. *Pain*, 152(8): 1909-1922.
- Quintero L., Cuesta M. C., Silva J. A., Arcaya J. L., Pinerua-Suhaibar L., Maixner W., Suarez-Roca H. (2003). Repeated swim stress increases pain-induced expression of c-Fos in the rat lumbar cord. *Brain Research*, 965(1-2): 259-268.
- Quintero L., Moreno M., Avila C., Arcaya J., Maixner W., Suarez-Roca H. (2000). Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 67(3): 449-458.
- Quirk K., Blurton P., Fletcher S., Leeson F., Tang F., Mellilo D., Ragan C. I., McKernan R. M. (1996). [³H]L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABA_A receptors which contain the $\alpha 5$ subunit. *Neuropharmacology*, 35(9-10): 1331-1335.
- Radhakrishnan R., Moore S. A., Sluka K. A. (2003). Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*, 104(3): 567-577.
- Radhakrishnan R., Sluka K. A. (2009). Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a preclinical model of chronic widespread muscle pain. *Neuroscience Letters*, 457(3): 141-145.
- Raghavendra V., Tanga F. Y., DeLeo J. A. (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *European Journal of Neuroscience*, 20(2): 467-473.
- Rao S. G., Gendreau J. F., Kranzler J. D. (2007). Understanding the fibromyalgia syndrome. *Psychopharmacology Bulletin*, 40(4): 24-67.
- Reichl S., Augustin M., Zahn P. K., Pogatzki-Zahn E. M. (2012). Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats. *Pain*, 153: 129-141.
- Ringkamp M., Raja S. N., Campbell J. N., Meyer R. A. (2013). Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. En McMahon S. B., Koltzenburg M., Tracey I., Turk D. C. (eds). *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Elsevier, Saunders, Philadelphia, pp. 1-30.
- Rocha-González H. I., Mao S., Álvarez-Leefmans F. J. (2008). Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport and intracellular chloride regulation in rat primary sensory neurons: thermodynamic and kinetic aspects. *Journal of Neurophysiology*, 100: 169-184.
- Röhl T., Kurreck J. (2006). RNA interference in pain research. *Journal of Neurochemistry*, 99: 371-380.

- Romero-Sandoval A., Chai N., Nutile-McMenemy N., Deleo J. A. (2008). A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Research*, 1219: 116-126.
- Ross J. L., Queme L. F., Cohen E. R., Green K. J., Lu P., Shank A. T., An S., Hudgins R. C., Jankowski M. P. (2016). Muscle IL-1 β drives ischemic myalgia via ASIC 3-mediated sensory neuron sensitization. *The Journal of Neuroscience*, 36(26): 6857-6871.
- Rossini M., Di M. O., Valentini G., Bianchi G., Biasi G., Cacace E., Malesci D., La M. G., Viapiana O., Adami S. (2007). Double-blind, multicenter trial comparing acetyl L-carnitine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25(2): 182-188.
- Rudolph U., Knoflach F. (2011). Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9): 685-697.
- Rudolph U., Möhler H. (2014). GABA_A receptor subtypes: therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54: 483-507.
- Rudomin P., Schmidt R. F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental Brain Research*, 129: 1-37.
- Russell I. J., Kamin M., Bennett R. M., Schnitzer T. J., Green J. A., Katz W. A. (2000). Efficacy of tramadol in treatment of pain in fibromyalgia. *Journal of Clinical Rheumatology*, 6(5): 250-257.
- Russell I. J., Orr M. D., Littman B., Vipraio G. A., Alboukrek D., Michalek J. E., Lopez Y., MacKillip F. (1994). Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism* 37(11): 1593-1601.
- Russell I. J., Vaeroy H., Javors M., Nyberg F. (1992). Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 35(5): 550-556.
- Rutledge D. N., Jones C. J. (2007). Effects of topical essential oil on exercise volume after a 12-week exercise program for women with fibromyalgia: a pilot study. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13(10): 1099-1106.
- Salemi S., Rethage J., Wollina U., Michel B. A., Gay R. E., Gay S., Sprott H. (2003). Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 30(1): 146-150.
- Sarchielli P., Di Filippo M., Nardi K., Calabresi P. (2007). Sensitization, glutamate, and the link between migraine and fibromyalgia. *Current Pain and Headache Reports*, 11(5): 343-351.

- Satoh M., Kuraishi Y., Kawamura M. (1992). Effects of intrathecal antibodies to substance-P, calcitonin gene-related peptide and galanin on repeated cold stress-induced hyperalgesia. *Pain*, 49(2): 273-278.
- Schäfers M., Sorkin L. S., Sommer C. (2003). Intramuscular injection of tumor necrosis factor- α induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain*, 104: 579-588.
- Schwarz M. J., Spath M., Muller-Bardorff H., Pongratz D. E., Bondy B., Ackenheil M. (1999). Relationship of substance P, 5-hydroxyindole acetic acid and tryptophan in serum of fibromyalgia patients. *Neuroscience Letters*, 259(3): 196-198.
- Serra J., Collado A., Solà R., Antonelli F., Torres X., Salgueiro M., Quiles C., Bostock H. (2014). Hyperexcitable C nociceptors in fibromyalgia. *Annals of Neurology*, 75(2): 196-208.
- Serwanski D. R., Miralles C. P., Christie S. B., Mehta A. K., Li X., De Blas A. L. (2006). Synaptic and nonsynaptic localization of GABA_A receptors containing the α_5 subunit in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 499: 458-470.
- Sharif-Naeini R., Basbaum A. (2011). Targeting pain where it resides... in the brain. *Science Translational Medicine*, 3(65): ps1.
- Shepard R. A., Nielsen E. B., Broadhurst P. L. (1982). Sex and strain differences in benzodiazepine receptor binding in roman rat strains. *European Journal of Pharmacology*, 77: 327-330.
- Shimizu K., Guo W. Wang H., Zou S., LaGraize S. C., Iwata K., Dubner R., Ren K. (2009). Differential involvement of trigeminal transition zone and laminated subnucleus caudalis in orofacial deep and cutaneous hyperalgesia: the effects of interleukin-10 and glial inhibitors. *Molecular Pain*, 5: 75.
- Sieghart W., Item C., Buchstaller A., Fuchs K., Höger H., Adamiker D. (1993). Evidence for the existence of differential O-glycosylated α_5 -subunits of the γ -aminobutyric acid_A receptor in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 60(1): 93-98.
- Siqueira-Lima P. S., Brito R. G., Araújo-Filho H. G., Santos P. L., Lucchesi A., Araújo A. A. S., Menezes P. P., Scotti L., Scotti M. T., Menezes I. R. A., Coutinho H. D. M., Zengin G., Aktumsek A., Antonioli A. R., Quintans-Júnior L. J., Quintans J. S. S. (2017). Anti-hyperalgesic effect of Lippia grata leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: Complemented with a molecular docking and antioxidant screening. *Biomedicine and Pharmacology*, 91: 739-747.
- Sivilotti L., Woolf C. J. (1994). The contribution of GABA_A and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 72: 169-179.

- Skyba D. A., Lisi T. L., Sluka K. A. (2005). Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horns after repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain*, 119(1-3): 142-149.
- Sluka K. A., Audette K. M. (2006). Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. *Molecular Pain*, 2: 13.
- Sluka K. A., Clauw D. J. (2016). Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Neuroscience*, 338: 114-129.
- Sluka K. A., Danielson J., Rasmussen L., DaSilva L. F. (2012). Exercise-induced pain requires NMDA receptor activation in the medullary raphe nuclei. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(3): 420-427.
- Sluka K. A., Kalra A., Moore S. A. (2001). Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle and Nerve*, 24(1): 37-46.
- Sluka K. A., O'Donnell J. M., Danielson J., Rasmussen L. A. (2013). Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. *Journal of Applied Physiology*, 114(6): 725-733.
- Sluka K. A., Price M. P., Breese N. M., Stucky C. L., Wemmie J. A., Welsh M. J. (2003). Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain*, 106(3): 229-239.
- Sluka K. A., Rasmussen L. A. (2010). Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle inflammation. *Pain*, 148(2): 188-197.
- Sluka K. A., Rohlwing J. J., Bussey R. A., Eikenberry S. A., Wilken J. M. (2002). Chronic muscle pain induced by repeated acid injection is reversed by spinally administered μ -, and δ -, but not κ -, opioid receptor agonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3): 1146-1150.
- Sluka, K. A. (2009). Is it possible to develop an animal model of fibromyalgia? *Pain*, 146(1-2): 3-4.
- Sprott H., Salemi S., Gay R. E., Bradley L. A., Alarcón G. S., Oh S. J., Michel B. A., Gay S. (2004). Increased DNA fragmentation and ultrastructural changes in fibromyalgic muscle fibers. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63: 245-251.
- Staud, R. (2012). Abnormal endogenous pain modulation is a shared characteristic of many chronic pain conditions. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 12(5): 577-585.

- Steiger J. L., Russek S. J. (2004). GABA_A receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *Pharmacology and Therapeutics*, 101: 259-281.
- Stein C., Clark J., Vasko O., Wilcox G., Overland A., Vanderah T., Spencer R. (2009). Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Research Reviews*, 60: 90-113.
- Suarez-Roca H., Leal L., Silva J. A., Pineura-Shuhaibar L., Quintero L. (2008). Reduced GABA neurotransmission underlies hyperalgesia induced by repeated forced swimming stress. *Behavioural Brain Research*, 189(1): 159-169.
- Suarez-Roca H., Quintero L., Arcaya J. L., Maixner W., Rao S. G. (2006). Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: differential effect of minalcipran. *Physiology and Behavior*, 88(1-2): 82-87.
- Sugimura N., Ikeuchi M., Izumi M., Kawano T., Aso K., Kato T., Ushida T., Yokoyama M., Tani T. (2015). Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. *European Journal of Pain*, 19(5): 629-638.
- Sung B., Lim G., Mao J. (2003). Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neurophatic pain in rats. *The Journal of Neuroscience*, 23: 2899-2910.
- Sung K. W., Kirby M., McDonald M. P., Lovinger D. M., Delpire E. (2000). Abnormal GABA_A receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter null mice. *Journal of Neuroscience*, 20: 7531-7538.
- Sur C., Fresub L., Howella O., McKernana R .M., Atack J. R. (1999). Autoradiographic localization of α₅ subunit-containing GABA_A receptors in rat brain. *Brain Research*, 822(1-2): 265-270.
- Suter M. R., Wen Y. R., Decosterd I., Ji R. R. (2007). Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biology*, 3: 255-268.
- Taguchi T., Katanosaka K., Yasui M., Hayashi K., Yamashita M., Wakatsuki K., Kiyama H., Yamanaka A., Mizumura K. (2015). Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain*, 156: 415-427.
- Takahashi A., Mashimo T. Uchida I. (2006). GABAergic tonic inhibition of substantia gelatinosa neurons in mouse spinal cord. *Neuroreport*, 17(12): 1331-1335.
- Tan P.-H., Yang L.-C., Shih H.-C., Lan K.-C., Cheng J.-T. (2005). Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Therapy*, 12: 59-66.

- Tanga F. Y., Raghavendra V., Nutile-McMenemy N., Marks A., DeLeo J. A. (2006). Role of astrocytes S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. *Neuroscience*, 140(3): 1003-1010.
- Tillu D. V., Hassler S. N., Burgos-Vega C. C., Quinn T. L., Sorge R. E., Dussor G., Boitano S., Vagner J., Price T. J. (2015). Protease activated receptor 2 (PAR₂) activation is sufficient to induce the transition to a chronic pain state. *Pain*, 156(5): 859-867.
- Tofferi J. K., Jackson J. L., O'malley P. G. (2004). Treatment of fibromyalgia with cyclobenzaprine: A meta-analysis. *Arthritis and Rheumatism*, 51(1): 9-13.
- Tonsfeldt K. J., Suchland K. L., Beeson K. A., Lowe J. D., Li M., Ingram S. L. (2016). Sex differences in GABA_A signaling in the periaqueductal gray induced by persistent inflammation. *The Journal of Neuroscience*, 36(5): 1669-1681.
- Tracey I., Mantyh P. W. (2007). The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, 55: 377-391.
- Tsuda M., Beggs S., Salter M. W., Inoue K. (2013). Microglia and intractable chronic pain. *Glia*, 61: 55-61.
- Tsuda M., Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Mizokoshi A., Kohsaka S., Salter M. W., Inoue K. (2003). P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424(6950): 778-783.
- Üceyler N., Zeller D., Kahn A. K., Kewenig S., Kittel-Schneider S., Schmid A., Casanova-Molla J., Reiners K., Sommer C. (2013). Small fiber pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain*, 136(6): 1857-1867.
- Valencia de Ita S., Lawand N. B., Lin Q., Castaneda-Hernandez G., Willis W. D. (2006). Role of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter in the development of capsaicin-induced neurogenic inflammation. *Journal of Neurophysiology*, 95: 3553-3561.
- van Rijnsoever C., Täuber M., Choulli M. K., Keist R., Rudolph U., Möhler H., Fritschy J. M., Crestani F. (2004). Requirement of alpha 5 GABA_A receptors for the development of tolerance to the sedative action of diazepam in mice. *The Journal of Neuroscience*, 24(30): 6785-6790.
- Vanegas H., Schaible H. G. (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research Reviews*, 46(3): 295-309.
- Verkuyl J. M., Hemby S. E., Joëls, M. (2004). Chronic stress attenuates GABAergic inhibition and alters gene expression of parvocellular neurons in rat hypothalamus. *European Journal of Neuroscience*, 20: 1665-1673.

- von Baeyer C. L., Champion D. (2010). Multiple pains as functional pain syndromes. *Journal of Pediatric Psychology*, 36(4): 433-437.
- von Hehn C. A., Baron R., Woolf C. J. (2012). Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*, 73: 638-652.
- Walker M. C., Semyanov A. (2008). Regulation of excitability by extrasynaptic GABA_A receptors. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 44: 29-48.
- Wallace D. J., Linker-Israeli M., Hallegua D., Silverman S., Silver D., Weisman M. H. (2001). Cytokines play an aetiopathogenic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology*, 40(7): 743-749.
- Wang D.-S., Zurek A. A., Lecker I., Yu J., Abramian A. M., Avramescu S., Davies P. A., Moss S. J., Lu W.-Y., Orser B. A. (2012). Memory deficits induced by inflammation are regulated by α_5 -subunit-containing GABA_A receptors. *Cell Reports*, 2(3): 488,496.
- Wang F., Zhan S., Zhang W., Hu R., Xia K. (2016). Intrathecal siRNA against Ski-interacting protein attenuates nociception in a rat model of neuropathic pain. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9(2): 2542-2548.
- Wang H., Moser M., Schiltenswolf M., Buchner M. (2008). Circulating cytokine levels compared to pain in patients with fibromyalgia. A prospective longitudinal study over 6 months. *Journal of Rheumatology*, 35: 1366-1370.
- Wang M. (2011). Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Frontiers in Endocrinology*, 2(44): 1-23.
- Williams A. E., Heitkemper M., Self M. M., Czyzewski D. I., Shulman R. J. (2013). Endogenous inhibition of somatic pain is impaired in girls with irritable bowel syndrome. *Journal of Pain*, 14(9): 921-930.
- Williams D. A., Clauw D. J. (2009). Understanding fibromyalgia: lessons from the broader pain research community. *Journal of Pain*, 10: 777-791.
- Willis D. W., Coggeshall R. E. (2004). Sensory mechanisms of the spinal cord: Ascending sensory tracts and their descending control. Volume 2, Third Edition. Springer Science & Business Media.
- Willis W. D. (1999). Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Experimental Brain Research*, 124: 395-421.
- Witschi R., Punnakkai P., Paul J., Walczak J. S., Cervero F., Fritschy J-M., Kuner R., Keist R., Rudolph U., Zeilhofer H. U. (2011). Presynaptic α_2 -GABA_A receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control. *The Journal of Neuroscience*, 31(22): 8134-8142.

- Wolfe F., Clauw D. J., Fitzcharles M. A., Goldenberg D. L., Häuser W., Katz R. S., Mease P., Russell A. S., Russell I. J., Winfield J. B. (2011). Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia. *Journal of Rheumatology*, 38(6): 1113-1122.
- Wolfe F., Smythe H. A., Yunus M. B., Bennett R. M., Bombardier C., Goldenberg D. L., Tugwell P., Campbell S. M., Abeles M., Clark P., Fam A. G., Farber S. J., Fiechtner J. J., Franklin C. M., Gatter R. A., Hamaty D., Lessard J., Lichtbroun A. S., Masi A. T., McCain G. A., Reynolds W. J., Romano T. J., Russell I. J., Sheon R. P. (1990). The American College of Rheumatology criteria for the classification of fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis and Rheumatology*, 33(2): 160-172.
- Wood P. B., Glabus M. F., Simpson R., Patterson II J. C. (2009). Changes in gray matter density in fibromyalgia: correlation with dopamine metabolism. *Journal of Pain*, 10(6): 609-618.
- Woolf C. J. (2004). Pain: Moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140: 441-451.
- Woolf C. J., Ma Q. (2007). Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3): 353-364.
- Woolf C. J., Shortland P., Sivilotti L. G. (1994). Sensitization of high mechanothreshold superficial dorsal horn and flexor motor neurons following chemosensitive primary afferent activation. *Pain*, 58: 141-155.
- Wu F., Bian J., Miao X., Huang S., Xu X., Gong D., Sun Y., Lu Z., Yu W. (2010). Intrathecal siRNA against Toll-like receptor 4 reduces nociception in a rat model of neuropathic pain. *International Journal of Medical Sciences*, 7(5): 251-259.
- Wu Y. Y., Jiang Y. L., He X. F., Zhao X. Y., Shao X. M., Du J. Y., Fnag J. Q. (2015). Effects of electroacupuncture with dominant frequency at SP 6 and ST 36 based on meridian theory on pain-depression dyad in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 732845.
- Wu Z., Guo Z., Gearing M., Chen G. (2014). Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model. *Nature Communications*, 5: 4159.
- Xiao H.-S., Huang Q.-H., Zhang F.-X., Bao L., Lu Y.-J., Guo C., Yang L., Huang W.-J., Fu G., Xu S.-H., Cheng X.-P., Yan Q., Zhu Z.-D., Zhang X., Chen Z., Han Z.-G., Zhang X. (2002). Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12): 8360-8365.

- Xie Y. F., Zhang S., Chiang C. Y., Hu J. W., Dostrovsky J. O., Sessle B. J. (2007). Involvement of glia in central sensitization in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). *Brain, behavior, and immunity*, 21(5): 634-641.
- Xue M., Liu J. P., Yang Y. H., Suo Z. W., Yang X., Hu X. D. (2017). Inhibition of α_5 subunit-containing GABA_A receptors facilitated spinal nociceptive transmission and plasticity. *European Journal of Pain*, 21(6): 1061-1071.
- Yaksh, T.L. (1989). Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain*, 37: 111-123.
- Yang L., Zhang F.-X., Huang F., Lu Y.-J., Li G.-D., Bao L., Xiao H.-S., Zhang X. (2004). Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 19: 871-883.
- Yasui M., Yoshimura T., Takeuchi S., Tokizane K., Tsuda M., Inoue K., Kiyama H. (2014). A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation. *Glia*, 62(9): 1407-1417.
- Yen L.-T., Hsieh C.-L., Hsu H.-C., Lin Y.-W. (2017). Targeting ASIC3 for relieving mice fibromyalgia pain: roles of electroacupuncture, opioid, and adenosine. *Nature Scientific Reports*, 7: 46663.
- Yokoyama T., Lisi T. L., Moore S. A., Sluka K. A. (2007). Muscle fatigue increases the probability of developing hyperalgesia in mice. *Journal of Pain*, 8(9): 692-699.
- Yunus, M. B. (2007). Fibromyalgia and overlapping disorders: the unifying concept of central sensitivity syndromes. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 36: 339-356.
- Zarnowska E. D., Keist R., Rudolph U., Pearce R. A. (2009). GABA_A receptor α_5 subunits contribute to GABA_A, slow synaptic inhibition in mouse hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 101(3): 1179-1191.
- Zeilhofer H. U. (2008). Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain- contributions of inflammation and microglia. *International Immunopharmacology*, 8: 182-187.
- Zeilhofer H. U., Benke D., Yevenes G. E. (2012b). Chronic pain states: Pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52: 111-133.
- Zeilhofer H. U., Möhler H., Di Lio A. (2009). GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(8): 397-402.

- Zeilhofer H. U., Wildner H., Yevenes G. E. (2012a). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological Reviews*, 92: 193-235.
- Zeilhofer H. U., Zeilhofer U. B. (2008). Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neuroscience Letters*, 437: 170-174.
- Zhang T., Xue R., Zhu L., Li J., Fan Q., Zhong B., Li Y., Ye C., Zhang Y. (2016). Evaluation of the analgesic effects of amroxetine, a novel potent serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37: 1154-1165.
- Zhang Z., Wang X., Wang W., Lu Y-G., Pan Z. Z. (2013). Brain-derived neurotrophic factor-mediated downregulation of brainstem K⁺-Cl⁻ cotransporter and cell-type—specific GABA impairment for activation of descending pain facilitation. *Molecular Pharmacology*, 84: 511-520.
- Zhu Y., Dua S., Gold M. S. (2012). Inflammation-induced shift in spinal GABA_A signaling is associated with a tyrosine-kinase dependent increase in GABA_A current density in nociceptive afferents. *Journal of Neurophysiology*, 108: 2581-2593.
- Zhuang Z. Y., Kawasaki Y., Tan P. H., Wen Y. R., Huang J., Ji R. R. (2007). Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(5): 642-651.
- Zimmermann M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-110.
- Zurek A. A., Kemp S. W., Aga Z., Walker S., Milenkovic M., Ramsey A. J., Sibille E., Scherer S. W., Orser B. A. (2016). α_5 GABA_A receptor deficiency causes autism-like behaviors. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 3(5): 392-398.