



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

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES TLR5 Y RAGE EN UN
MODELO DE FIBROMIALGIA EN RATAS**

Tesis que presenta

Q.F.B. Luis Enrique Villanueva Solís

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en

Neurofarmacología Y Terapéutica Experimental

Director de la tesis:

Dr. Vinicio Granados Soto

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Dolor (Laboratorio 12), del Departamento de Farmacobiología, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) a través del Programa de Becas Nacionales, con la beca de maestría número 1008858. Además, se contó con el apoyo del proyecto de Conacyt A-S1-40015.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vinicio Granados Soto, por brindarme la confianza de formar parte del Laboratorio de Neurobiología del Dolor, por todo el apoyo otorgado en el transcurso de la presente investigación y por la paciencia que tuvo conmigo en estas épocas de pandemia. Si me salió contar esta historia.

A la Dra. Janet Murbartían Aguilar y a la Dra. Myrna Déciga Campos, por aceptar formar parte de mi sínodo. Sus valiosas críticas, comentarios, consejos y aportaciones hicieron que este trabajo evolucionara de manera correcta e importante.

A todos los miembros del Laboratorio 4 y 12, por sus aportes al proyecto y su disposición para ayudar. Sofí, Miguel, Mara y Adal, gracias porque el chismecito y las risas no faltaron.

Yarim y Erick, un “gracias” no basta para describir todo lo que significó su apoyo, sin ustedes yo sería un costal de papas. Ya les debo muchas banqueteras.

A Gaby, Monse, Itz, Sofí, Dani, Martín, Saúl y Manu, por aguantar mis dramas y mis achaques. Los quiero.

DEDICATORIAS

A Julieta y Enrique, mi papás, por su amor y apoyo incondicional. Ustedes han sido, y siempre serán, el motor principal de este carrito destartado que se va desarmando al caminar, pero que ha llegado muy lejos y no va a parar. Los amo.

A Eduardo, Jimena y Daniel, por ser mis confidentes y mis anclas. Gracias por ayudarme a ser una mejor persona. Los amo.

A mis abuelitos, Dolores y Marcelo, porque nunca dejaron de confiar en mí. Sus palabras de aliento y lecciones de vida las llevaré conmigo todo lo que me reste de camino.

A Guadalupe y Gerardo Solís, por toda la ayuda que me brindaron en este proceso. Perdón por siempre hacer que se preocuparan, les agradezco mucho que siempre estén presentes.

A la “familia bajo13”, porque saben cómo sacar la mejor versión de mí. La distancia nunca fue un impedimento para sentirlos cerca.

A los animales de laboratorio, gracias infinitas.

“Tienes la fuerza de tu grandeza, pero tienes que tomar el timón y decidir tu propio curso. Síguelo, no importa que duela, y cuando el tiempo venga a decirte que tienes que izar tus velas y ser todo un hombre yo espero estar ahí recibiendo algo de la luz que emitas ese día.”

ÍNDICE

| | |
|---|-------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | x |
| ABREVIATURAS..... | xi |
| RESUMEN..... | xiv |
| ABSTRACT..... | xv |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Dolor..... | 1 |
| 1.2 Nocicepción..... | 2 |
| 1.2.1 Transmisión nociceptiva..... | 4 |
| 1.3 Clasificación del dolor..... | 5 |
| 1.4. Sensibilización..... | 8 |
| 1.4.1 Sensibilización periférica..... | 8 |
| 1.4.2 Sensibilización central | 10 |
| 1.5 Inhibición y desinhibición GABAérgica..... | 10 |
| 2. ANTECEDENTES PARTICULARES | 14 |
| 2.1 Fibromialgia | 14 |
| 2.1.1 Farmacología de la fibromialgia..... | 17 |
| 2.2 Modelos de fibromialgia | 18 |
| 2.2.1 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina | 22 |
| 2.3 La alarmina HMGB1..... | 23 |
| 2.3.1 HMGB1 y la unión a receptores | 24 |
| 2.4 Receptores tipo Toll | 26 |
| 2.4.1 El TLR5 y su papel en el dolor..... | 27 |
| 2.5 El RAGE..... | 28 |
| 2.5.1 El RAGE y el dolor..... | 29 |
| 2.6 HMGB1, TLR5 y RAGE en el dolor | 30 |
| 3. HIPÓTESIS | 37 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 37 |
| 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 37 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 6.1 Animales..... | 38 |
| 6.2 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina | 38 |
| 6.3 Alodinia táctil | 38 |
| 6.4 Hiperalgnesia muscular | 39 |
| 6.5 Obtención del tejido para realizar western blot..... | 39 |
| 6.6 Expresión de las proteínas TLR5 y RAGE | 40 |
| 6.7 Fármacos | 41 |
| 6.8 Análisis de los datos y estadística | 41 |
| 7. DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 42 |
| 7.1 Inducción del modelo de fibromialgia..... | 42 |
| 7.2 Evaluación farmacológica | 42 |
| 7.3 Determinación de la expresión de TLR5 y RAGE por western-blot. | 43 |
| 8. RESULTADOS..... | 45 |
| 8.1 La reserpina indujo la aparición de conductas nociceptivas | 45 |
| 8.2. El antagonista de TLR5 (TH1020) revirtió parcialmente la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas | 46 |
| 8.3. El antagonista de RAGE (FPS-ZM1) revirtió la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas | 46 |
| 8.4. El antagonista de TLR5 (TH1020) no revirtió la hiperalgnesia muscular inducida por la administración de reserpina en ratas | 47 |
| 8.5. El antagonista de RAGE (FPS-ZM1) no modificó la hiperalgnesia muscular inducida por la administración de reserpina en ratas | 48 |
| 8.6. El antagonista de TLR5 (TH1020) no modificó el umbral en ratas hembra naïve | 49 |
| 8.7. El antagonista de RAGE (FPS-ZM1) no modificó el umbral en ratas hembra naïve | 51 |
| 8.8. Expresión de TLR5 y RAGE en ratas con fibromialgia..... | 52 |
| 9. DISCUSIÓN | 55 |
| 9.1. Alteraciones en la nocicepción inducidas por la administración de reserpina . | 55 |
| 9.2. TLR5 y RAGE participaron en el mantenimiento de la hipersensibilidad nociceptiva inducida por reserpina..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 9.3. TLR5 y RAGE no participaron en el mantenimiento de la hiperalgesia muscular en el modelo de fibromialgia..... | 57 |
| 9.4. La reserpina aumentó la expresión de las proteínas de TLR5 y RAGE..... | 58 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 60 |
| 11. PERSPECTIVAS | 61 |
| 12. REFERENCIAS | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Características de los nociceptores..... | 4 |
| Figura 2. El sistema de nocicepción..... | 5 |
| Figura 3. Los principales tipos de dolor..... | 7 |
| Figura 4. Sensibilización periférica. | 9 |
| Figura 5. Sensibilización central..... | 11 |
| Figura 6. Desinhibición GABAérgica..... | 13 |
| Figura 7. Criterios para el diagnóstico de la fibromialgia..... | 15 |
| Figura 8. Mecanismos propuestos en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. | 23 |
| Figura 9. Estructura y estados de oxidación de HMGB1..... | 25 |
| Figura 10. Estructura de los TLR..... | 26 |
| Figura 11. Estructura del RAGE y sus ligandos. | 29 |
| Figura 12. Diseño experimental de la evaluación conductual correspondiente al establecimiento del modelo de fibromialgia inducido por reserpina. | 42 |
| Figura 13. Diseño experimental de la evaluación del efecto en la alodinia e hiperalgesia de los fármacos en ratas reserpinizadas. | 43 |
| Figura 14. Diseño experimental para la extracción de médula espinal (ME) y ganglio de la raíz dorsal (GRD) para el análisis por western blot | 44 |
| Figura 15. Curso temporal de la alodinia táctil e hiperalgesia muscular asociada con la administración de reserpina en ratas hembra. | 45 |
| Figura 16. Efecto del TH1020 sobre la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas hembra. | 46 |
| Figura 17. Efecto del FPS-ZM1 sobre la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas hembra..... | 47 |
| Figura 18. Efecto del TH1020 sobre la hiperalgesia muscular inducida por la administración de reserpina en ratas hembra. | 48 |
| Figura 19. Efecto del FPS-ZM1 sobre la hiperalgesia muscular inducida por la administración de reserpina en ratas hembra. | 49 |
| Figura 20. Efecto del TH1020 sobre la alodinia táctil en ratas hembra naïve.. | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 21. Efecto del TH1020 sobre la hiperalgesia muscular en ratas hembra naïve. | 50 |
| Figura 22. Efecto del FPS-ZM1 sobre la alodinia táctil en ratas hembra naïve. | 51 |
| Figura 23. Efecto del FPS-ZM1 sobre la hiperalgesia muscular en ratas hembra naïve. | 52 |
| Figura 24. Expresión de la proteína del receptor TLR5 en la médula espinal (ME) y en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) posterior a la administración de reserpina en ratas hembra. | 53 |
| Figura 25. Expresión de la proteína del receptor RAGE en la médula espinal (ME) y en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) posterior a la administración de reserpina en ratas hembra. | 54 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Tratamientos farmacológicos de la fibromialgia (FM). | 17 |
| Tabla 2. Modelos animales de fibromialgia y sus principales hallazgos. | 18 |
| Tabla 3. Papel de las proteínas HMGB1, TLR5 y RAGE en el dolor. | 31 |
| Tabla 4. Concentraciones de los fármacos. | 43 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| 5-HT | 5-hidroxitriptamina |
| ABC | Área bajo la curva |
| ACR | Colegio Americano de Reumatología |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AGE | Productos finales de glicación avanzada |
| AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ASIC | Canales sensibles a ácido |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| CFA | Adyuvante completo de Freund |
| CGRP | Péptido relacionado con el gen de la calcitonina |
| DA | Dopamina |
| DAMP | Patrón molecular asociado a daño |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EE | Error estándar |
| EPSC | Corriente postsináptica excitatoria |
| ERK | Cinasa regulada por señales extracelulares |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GDNF | Factor neurotrófico derivado de la glía |
| GRD | Ganglio de la raíz dorsal |
| GT | Ganglio del trigémino |
| HMGB1 | Proteína de alta movilidad del grupo 1 |
| i.p. | Intraperitoneal |
| i.pl. | Intraplantar |
| i.t. | Intratecal |
| IB4 | Isolectina B4 |
| IKK | Cinasa I κ B |
| IL-10 | Interleucina 10 |

| | |
|--------------------------------|---|
| IL-1β | Interleucina 1 β |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| INF-γ | Interferón γ |
| JAK | Cinasas de Janus |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| LIF | Factor de inhibición de leucemia |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LRR | Motivos repetidos ricos en leucina |
| MAPK | Proteína cinasa activada por mitógenos |
| MyD88 | Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 |
| NA | Noradrenalina |
| Nav | Canales de sodio dependientes de voltaje |
| NFκB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B |
| NGF | Factor de crecimiento neural |
| NLS | Secuencia de localización nuclear |
| NMDA | Ácido N-metil-D-aspartico |
| NO | Óxido nítrico |
| NPY | Neuropéptido Y |
| PAMP | Patrón molecular asociado a patógenos |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-cinasa |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PRR | Receptores de reconocimiento de patrones |
| RAGE | Receptor de productos de glicación avanzada |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNP | Sistema nervioso periférico |
| SP | Sustancia P |

| | |
|-------------|--|
| STAT | Proteína de transducción de señales y activadora de la transcripción |
| TIR | Receptor Toll/interleucina 1 |
| TLR | Receptores tipo Toll |
| TrkA | Receptor de tropomiosina cinasa A |
| TRPV | Receptor de potencial transitorio vaniloide |
| TTX | Tetrodotoxina |

RESUMEN

La fibromialgia se caracteriza por la presencia de dolor músculo-esquelético generalizado para el cual no se cuenta con un origen definido. El propósito de este estudio fue determinar la participación de TLR5 y RAGE en un modelo de fibromialgia inducido por reserpina en ratas. La administración subcutánea de reserpina (1 mg/kg) durante 3 días en ratas Wistar hembras de 200-250 g produjo alodinia táctil e hiperalgesia muscular generalizadas a los días 5 y 7 posteriores a la última inyección de reserpina, respectivamente. Para determinar la alodinia táctil se utilizaron los filamentos de von Frey y para evaluar la hiperalgesia muscular se utilizó la prueba de Randall-Selitto. Los fármacos TH1020 y FPS-ZM1 (antagonistas de TLR5 y RAGE, respectivamente) fueron administrados por vía intratecal. El TH1020 revirtió de manera parcial la alodinia táctil producida por la reserpina de manera dosis dependiente en las ratas. Sin embargo, este fármaco no tuvo efecto en la hiperalgesia muscular producida en este modelo. Por otro lado, el tratamiento con FPS-ZM1 tuvo un mayor efecto en la reversión de la alodinia táctil producida por la reserpina. En contraste, la administración del antagonista de RAGE no tuvo efecto en la hiperalgesia muscular en este modelo. La administración de los vehículos de ambos fármacos no tuvo efecto sobre la alodinia o hiperalgesia en dicho modelo. La administración de reserpina aumentó la expresión de TLR5 y RAGE en el ganglio de la raíz dorsal y en la médula espinal, de ratas hembra. Estos datos sugieren que los TLR5 y RAGE contribuyen al mantenimiento de la hipersensibilidad (alodinia táctil) observada en este modelo de fibromialgia, siendo RAGE el de mayor contribución.

ABSTRACT

Fibromyalgia is characterized by the presence of widespread musculoskeletal pain for which there is no defined cause. The purpose of this study was to determine the involvement of TLR5 and RAGE receptors in a rat model of reserpine-induced fibromyalgia in female rats. Subcutaneous administration of reserpine (1 mg/kg) for 3 consecutive days in 200-250 g female Wistar rats produced generalized tactile allodynia and muscle hyperalgesia at days 5 and 7 following the last reserpine injection, respectively. Von Frey filaments were used to determine tactile allodynia and the Randall-Selitto test was used to assess muscle hyperalgesia. TH1020 and FPS-ZM1 (TLR5 and RAGE antagonists, respectively) were administered intrathecally. TH1020 partially reversed tactile allodynia produced by reserpine in a dose-dependent manner in rats. However, it had no effect on the muscular hyperalgesia produced in this model. On the other hand, treatment with FPS-ZM1 had a greater effect on the reversal of tactile allodynia produced by reserpine. Nonetheless, administration of the RAGE antagonist had no effect on muscle hyperalgesia produced in this model. Administration of both drug vehicles had no effect on allodynia or hyperalgesia in this model. Moreover, reserpine injection increased the TLR5 and RAGE protein expression in dorsal root ganglia and spinal cord. These data suggest that TLR5 and RAGE contribute to the maintenance of the hypersensitivity (tactile allodynia) observed in this model of reserpine-induced fibromyalgia, being RAGE the major contributor.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dolor

El dolor es una respuesta del organismo ante estímulos físicos, químicos o mecánicos que ponen en riesgo su integridad. El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable típicamente causada, o parecida a la causada, por una lesión tisular real o potencial (Raja et al., 2020). Por tanto, las vías del dolor forman un sistema sensorial, dinámico y complejo que ha evolucionado para detectar, integrar y coordinar una respuesta de protección ante la entrada de estímulos nocivos que pueden dañar tejidos u órganos (Bourne, 2014). Cuando existe un procesamiento anormal de la información nociceptiva, el dolor se vuelve patológico. Si el dolor persiste por un periodo largo de tiempo y no se puede tratar de manera convencional, se le refiere como dolor crónico (Hylands-White, 2017). Éste se define como el dolor que logra persistir o que reaparece por un periodo mayor a 3 meses (Treede et al., 2015). La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) clasifica al dolor crónico en dos categorías: el dolor crónico primario y el dolor crónico secundario. El dolor crónico primario es aquel que se presenta en una o más regiones anatómicas, que persiste o se repite por un periodo mayor a 3 meses acompañado con desequilibrio emocional o discapacidad funcional y que no puede ser explicado por otras condiciones, es considerado en sí mismo como una enfermedad. Por otro lado, los síndromes de dolor crónico secundario son aquellos asociados a otras patologías como causa subyacente, para las que el dolor es considerado como un síntoma (Treede et al., 2019; Nicholas et al., 2019).

El dolor es un problema de salud a nivel mundial. Se estima que el dolor afecta alrededor del 25 al 29% de la población mundial y cerca del 10% de los adultos son diagnosticados con dolor crónico cada año, con cientos de miles de millones de dólares en costos anuales relacionados con la atención de la salud, los salarios perdidos y la falta de productividad. En México, en el 2010, se estimó que más de 28 millones de personas padecían de dolor crónico (Covarrubias-Gómez et al., 2010; Goldberg, 2011; Buchman, 2019).

1.2 Nocicepción

El dolor es una experiencia subjetiva producida dentro del cerebro que se asocia integralmente a comportamientos emocionales, cognitivos y aprendidos. Sin embargo, hay sitios distintos al cerebro que participan en las etapas iniciales de la producción del dolor: las fibras aferentes primarias periféricas y el asta dorsal de la médula espinal (Basbaum y Woolf, 1999).

La nocicepción se define como la detección de estímulos dolorosos. Es un proceso mediante el cual un organismo detecta estímulos externos intensos y nocivos (químicos, mecánicos o térmicos) a través de una subpoblación de fibras nerviosas periféricas denominadas nociceptores (Basbaum et al., 2009; Lohman et al., 2014; Renthal, 2020). Los cuerpos celulares de los nociceptores se localizan en el ganglio del trigémino (GT) y el ganglio de la raíz dorsal (GRD) e inervan las regiones de la cabeza y el cuerpo, respectivamente. Los nociceptores tienen una estructura pseudounipolar, presentan un axón que bifurca en una terminal periférica que inerva al órgano blanco y una terminal central que hace sinapsis en la médula espinal con una neurona de segundo orden. Esta estructura permite la detección del estímulo nocivo a lo largo de la fibra nerviosa (Julius y Basbaum, 2001; Renthal, 2015).

La capacidad que tienen los nociceptores para diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos se debe al alto umbral de activación que poseen. Esto les permite codificar la intensidad de un estímulo hasta considerarlo perjudicial o potencialmente perjudicial (Woolf y Ma, 2007). Los nociceptores se clasifican en fibras C no mielinizadas y en fibras A mielinizadas (Dubin y Patapoutian, 2010). Estos a su vez se subdividen tomando en cuenta su tamaño, estructura y velocidad de conducción (Djouri y Lawson, 2004) (**Figura 1**).

Fibras A mielinizadas:

- a. Las fibras A β son mecanorreceptores de bajo umbral de activación, se caracterizan por ser de diámetro grande (mayor a 10 μ m), de velocidad de conducción rápida (30-100 m/s) y transmiten información no dolorosa, táctil y de la propiocepción sobre las láminas III-VI del asta dorsal de la médula espinal (Todd, 2010; Braz et al., 2014).

- b. Las fibras A δ regulan el dolor primario (agudo, rápido y punzante) evocado por estímulos nocivos. Estas fibras tienen un diámetro mediano (2-6 μm), se encuentran ligeramente mielinizadas y presentan una velocidad de conducción intermedia (6-30 m/s) (Basbaum y Jessell, 2000). Las fibras A δ se subdividen en dos clases:
- Fibras A δ tipo I: responden a estímulos mecánicos y químicos, pero tienen un umbral de activación alto ante estímulos térmicos (<50°C).
 - Fibras A δ tipo II: poseen un umbral de activación bajo ante estímulos térmicos (40-45°C) por lo que responden preferencialmente a estos. Sin embargo, también pueden responder a estímulos mecánicos, pero su umbral de activación es elevado.

Fibras C no mielinizadas:

- c. Las fibras C regulan el dolor secundario (retardado y difuso), se caracterizan por ser de diámetro pequeño (0.4-1.2 μm). La velocidad de transmisión de la información nociceptiva es lenta (0.5-2 m/s). Son sensibles a estímulos mecánicos, térmicos y químicos por lo que se les conoce como fibras polimodales. Las fibras C representan el 70% de los nociceptores. Se subdividen en dos clases (Snider y McMahon, 1998; Julius y Basbaum, 2001; Braz et al., 2005; Basbaum, 2009):
- Fibras C peptidérgicas: sintetizan y liberan neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Además, expresan la cinasa A del receptor de tropomiosina (TrkA). Estas fibras proyectan principalmente sobre las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal.
 - Fibras C no peptidérgicas: se unen a la isolectina B4 (IB4), al receptor del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y expresan al receptor purinérgico P2X3. Estas fibras tienen proyecciones sobre la lámina interna II.

Se ha descrito una subpoblación de nociceptores llamados nociceptores silenciosos, lo cuales responden a estímulos eléctricos inducidos en campo, pero no son activados de manera fisiológica por estímulos mecánicos. Estos nociceptores forman parte de las

fibras C no mielinizadas y peptidérgicas. En condiciones patológicas son sensibilizados por mediadores inflamatorios como el NGF lo que les permite responder a estímulos mecánicos, es por esto por lo que se cree que tienen un papel importante en el mantenimiento de la hiperalgesia mecánica inducida por procesos inflamatorios (Prato et al., 2018; Jonas et al., 2020).

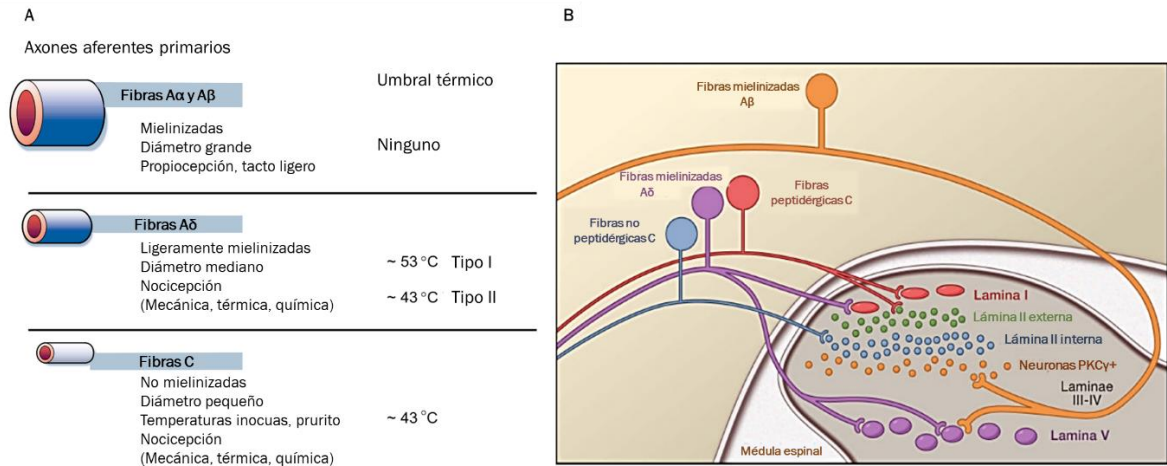


Figura 1. Características de los nociceptores. A) Nervios periféricos que incluyen aferentes mielinizadas de diámetro grande (Aα y Aβ), de diámetro mediano (Aδ) y aferentes no mielinizadas pequeñas (C). B) Conexiones entre las fibras aferentes primarias y neuronas en la médula espinal. Modificado de Julius y Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009.

1.2.1 Transmisión nociceptiva

La nocicepción comprende cuatro mecanismos (Woolf, 2004) (**Figura 2**):

- Transducción: este proceso consiste en la conversión de un estímulo nocivo (mecánico, térmico o químico) en señales eléctricas.
- Conducción: es la propagación de potenciales de acción desde las terminales periféricas, a través de los axones hasta las terminales centrales de los nociceptores en el sistema nervioso central (SNC).
- Transmisión: es la transferencia sináptica y la modulación de la entrada de las señales nociceptivas de una neurona a otra.
- Percepción: es la integración de los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia del dolor.

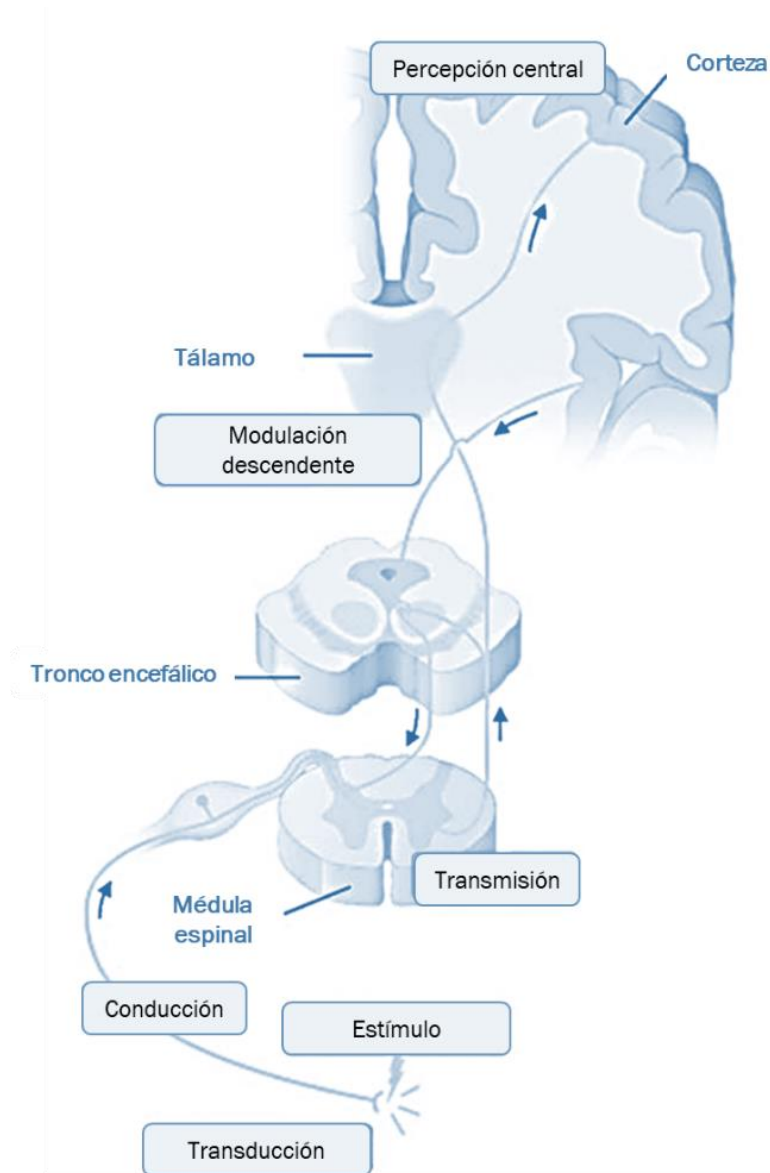


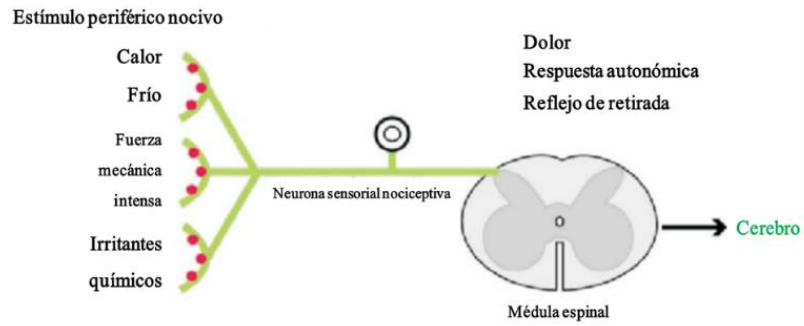
Figura 2. El sistema de nocicepción. La activación de los nociceptores por estímulos nocivos genera señales que viajan al asta dorsal de la médula espinal a través del ganglio de la raíz dorsal. Desde el asta dorsal, las señales son transportadas por la vía ascendente del dolor hasta el tálamo y la corteza. El dolor puede ser controlado por neuronas inhibitoras y facilitadoras. Las señales descendentes que se originan en los centros supraespinales pueden modular la actividad del asta dorsal controlando la transmisión espinal del dolor. Modificado de Fornasari, 2012.

1.3 Clasificación del dolor

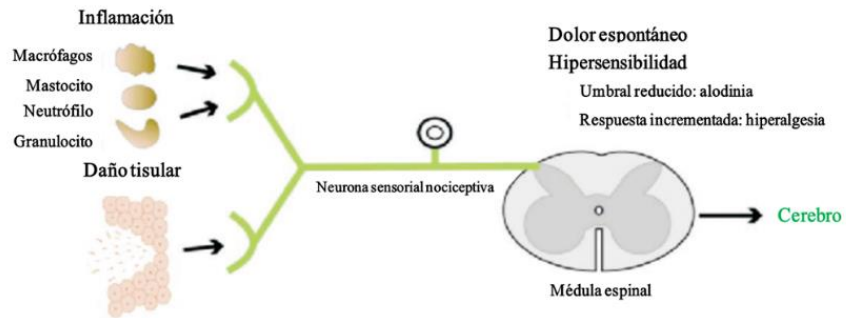
El dolor se clasifica de diferentes maneras. De acuerdo con el proceso neurobiológico que lo subyace y a las características fisiopatológicas que lo originan, el dolor se puede dividir en dos categorías, adaptativo y maladaptativo (Woolf, 2004) (**Figura 3**):

- a. El dolor adaptativo es de importancia para la supervivencia del organismo, protegiéndolo del daño o promoviendo procesos de curación del tejido dañado. Dos tipos de dolor se encuentran dentro de esta clasificación:
- Dolor nociceptivo. Es el que se origina por la activación de nociceptores que responden a un estímulo nocivo. El dolor nociceptivo surge de un daño real o potencial en tejidos no neuronales y puede clasificarse como visceral o somático (Cohen y Mao, 2014).
 - Dolor inflamatorio. Éste se genera durante el daño tisular y la consecuente liberación de mediadores inflamatorios como citocinas y factores de crecimiento, entre otros. Estos mediadores disminuyen el umbral de activación de los nociceptores que inervan el sitio del daño.
- b. El dolor maladaptativo ocurre como consecuencia de procesos patológicos en el sistema nervioso. Este tipo de dolor se produce cuando existe una lesión (dolor neuropático) o un mal funcionamiento (dolor funcional) del sistema nervioso. En este caso, el dolor se considera una enfermedad por sí sola y no como un síntoma asociado a otras patologías:
- Dolor neuropático. Este tipo de dolor surge como consecuencia de una lesión o un mal funcionamiento del tejido nervioso periférico o central. Éste puede persistir por meses o incluso años (Siddall, 1997; Bouhassira et al., 2008).
 - Dolor funcional. Éste se caracteriza por la presencia de dolor incapacitante sin un origen orgánico claro, ya que no presenta daño a los tejidos o inflamación aparente. Ejemplos de síndromes de dolor funcional son la fibromialgia, el síndrome de colon irritable o la cistitis intersticial. Se considera que el aumento en la percepción y sensibilidad al dolor se deben a un procesamiento aberrante de los estímulos nocivos en el SNC (Woolf, 2004; Hilliard, 2010; Basch, 2015).

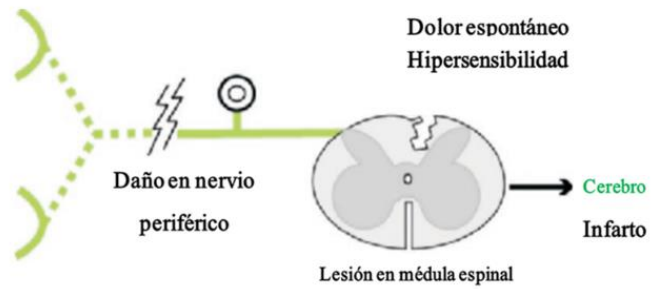
A. Dolor nociceptivo



B. Dolor inflamatorio



C. Dolor neuropático



D. Dolor disfuncional

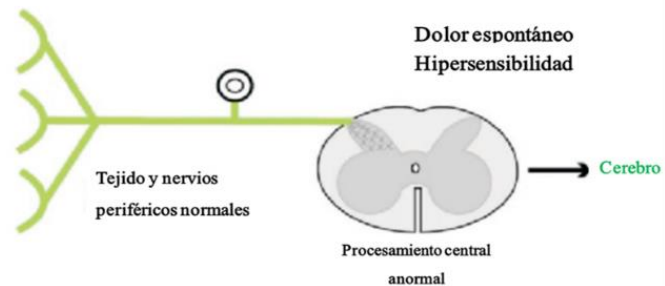


Figura 3. Los principales tipos de dolor. Modificado de Woolf et al., 2004.

1.4. Sensibilización

La sensibilización es el proceso que ocurre como consecuencia de un daño al tejido o a las fibras nerviosas, lo que provoca un aumento de la frecuencia de disparos espontáneos o alteraciones en las propiedades de conducción o neurotransmisión. Esto facilita que un estímulo inocuo sea capaz de excitar a las neuronas periféricas. El fenómeno de sensibilización se da tanto a nivel periférico como central (Woolf, 2004; Basbaum, 2009).

1.4.1 Sensibilización periférica

La sensibilización periférica ocurre después de un proceso de inflamación periférica e involucra la reducción del umbral de activación y el aumento de la excitabilidad de las terminales periféricas de los nociceptores en respuesta a mediadores inflamatorios sensibilizantes (McMahon et al., 2008) (**Figura 4**). El daño producido en los tejidos generalmente se ve acompañado con la infiltración de células no neuronales (células cebadas, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos). Estas células, en conjunto con las células residentes, liberan mediadores inflamatorios como neurotransmisores, péptidos (bradicinina), eicosanoides y lípidos relacionados (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocannabinoides), citocinas (interleucinas, factor de necrosis tumoral), quimiocinas, proteasas y protones (Basbaum, 2009; Bourne, 2014).

Los nociceptores expresan receptores que son capaces de reconocer y responder a los mediadores inflamatorios liberados. Esta interacción aumenta la excitabilidad de las fibras nerviosas induciendo la activación de segundos mensajeros y de múltiples cascadas de señalización que involucran a la fosfolipasa C (PLC), a las proteínas cinasas A (PKA) y C (PKC), a la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y a las cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Este aumento de la excitabilidad neuronal tiene como consecuencia que un estímulo inocuo (un contacto suave o un sutil cambio de temperatura) en el área de inflamación sea percibido como doloroso (alodinia) o que un estímulo que comúnmente es incómodo o ligeramente doloroso se perciba como altamente doloroso (hiperalgesia) (Basbaum, 2009; von Hehn, 2012). La activación de estas vías de señalización y los cambios en la excitabilidad de las fibras nerviosas

inducen un aumento de la expresión de genes de proteínas como el receptor vaniloide de potencial transitorio 1 (TRPV1) y los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav2.2) (Hudson et al., 2001; Kim et al., 2008). Asimismo, las células dañadas liberan iones K^+ y factores de crecimiento como el factor de crecimiento neural (NGF) o el factor de inhibición de la leucemia (LIF). De manera similar, las neuronas sensoriales primarias liberan glutamato que activa a los receptores NMDA localizados en las células satélites, lo que hace que se liberen citocinas proinflamatorias que contribuyen a la sensibilización (Ferrari et al., 2014). La unión de los mediadores químicos liberados actuando sobre sus respectivos receptores puede producir directamente dolor, pero la mayoría sensibilizan a las terminales periféricas de los nociceptores (Levine y Reichling, 1999; Woolf, 2004).

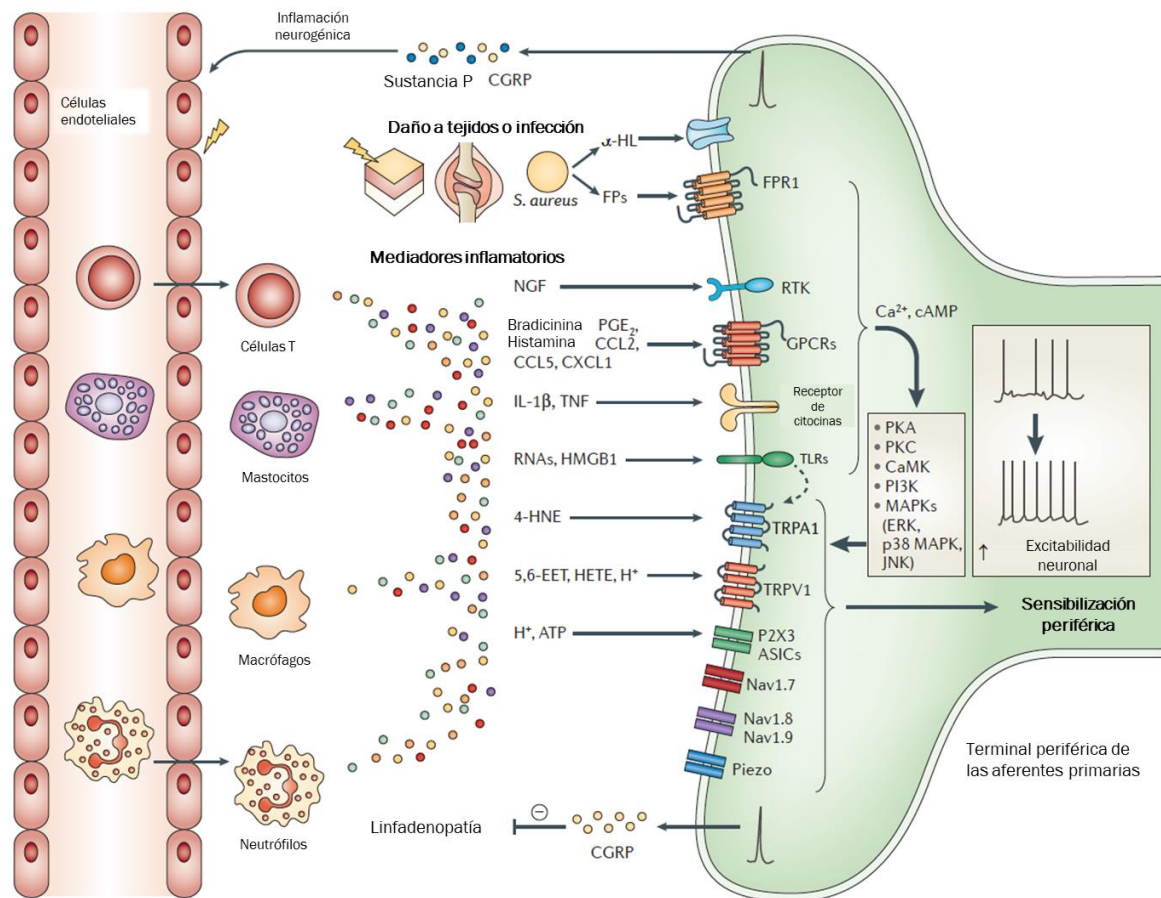


Figura 4. Sensibilización periférica. Una lesión a los tejidos permite la extravasación e infiltración de células del sistema inmune al sitio de daño. Estas células, en conjunto con las células residentes, liberan mediadores inflamatorios que actúan sobre sus receptores ubicados en las neuronas aferentes primarias. Esto incrementa la despolarización de la membrana y, en general, la excitabilidad neuronal. Modificado de Ji et al., 2014.

1.4.2 Sensibilización central

La sensibilización central es un estado de hiperexcitabilidad que se establece en el sistema nervioso central. Éste resulta de la amplificación y la facilitación de la transmisión sináptica entre la terminal central de las fibras aferentes primarias y las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (**Figura 5**). Un estímulo nocivo necesita ser intenso, repetido y sostenido para inducir sensibilización central (Latremoliere y Woolf, 2009). Dentro de los mecanismos que contribuyen al establecimiento de la sensibilización central se encuentran las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y la hipersensibilidad mediada por el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA). Durante el dolor agudo se produce la liberación de glutamato desde las terminales centrales de las fibras C y A δ hacia las neuronas del asta dorsal, generando corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs). Esto ocurre por la activación de los receptores pre y postsinápticos ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol propiónico (AMPA) y kainato, mientras que los receptores NMDA permanecen silentes. Sin embargo, cuando se produce una lesión en los nervios, el incremento en la liberación de neurotransmisores particularmente por la activación de las fibras C, genera una despolarización sostenida que remueve el bloqueo de Mg²⁺ sensible a voltaje del receptor NMDA. A su vez, la activación del receptor NMDA permite la entrada de iones Ca²⁺, lo cual promueve la activación de diferentes cinasas que fosforilan a los NMDA. La fosforilación de los receptores NMDA fomenta cambios de larga duración en la excitabilidad de las neuronas del asta dorsal, lo que favorece el fortalecimiento de las conexiones sinápticas entre los nociceptores y las neuronas del asta dorsal (Woolf y Salter, 2000; Costigan y Woolf, 2000; Woolf, 2004; Basbaum, 2009; Latremoliere y Woolf, 2009; Fornasari, 2012).

Otro mecanismo que contribuye al desarrollo de sensibilización central es la desinhibición GABAérgica (von Hehn et al., 2012).

1.5 Inhibición y desinhibición GABAérgica

Los estímulos sensoriales se procesan en el SNC y dependen en gran medida de la transmisión sináptica inhibitoria. Estos sistemas de inhibición están regulados, tanto a nivel presináptico como postsináptico, por proyecciones neuronales descendentes

(noradrenérgicas, serotoninérgicas y opioidérgicas) y por interneuronas localizadas en la médula espinal (Woolf, 2004; Todd, 2010). Se cree que las interneuronas que regulan dicha inhibición utilizan GABA o glicina como neurotransmisores y se distribuyen en las láminas I-III del asta dorsal de la médula espinal, siendo aquellas neuronas ricas en glicina las predominantes en la lámina III (Bardoni et al., 2013; Todd, 2017).

Ambos neurotransmisores (GABA y glicina) actúan en sus respectivos receptores localizados en las neuronas de segundo orden. Sin embargo, solo el GABA actúa en receptores presinápticos de las terminales centrales de las aferentes primarias (Price y Prescott, 2015).

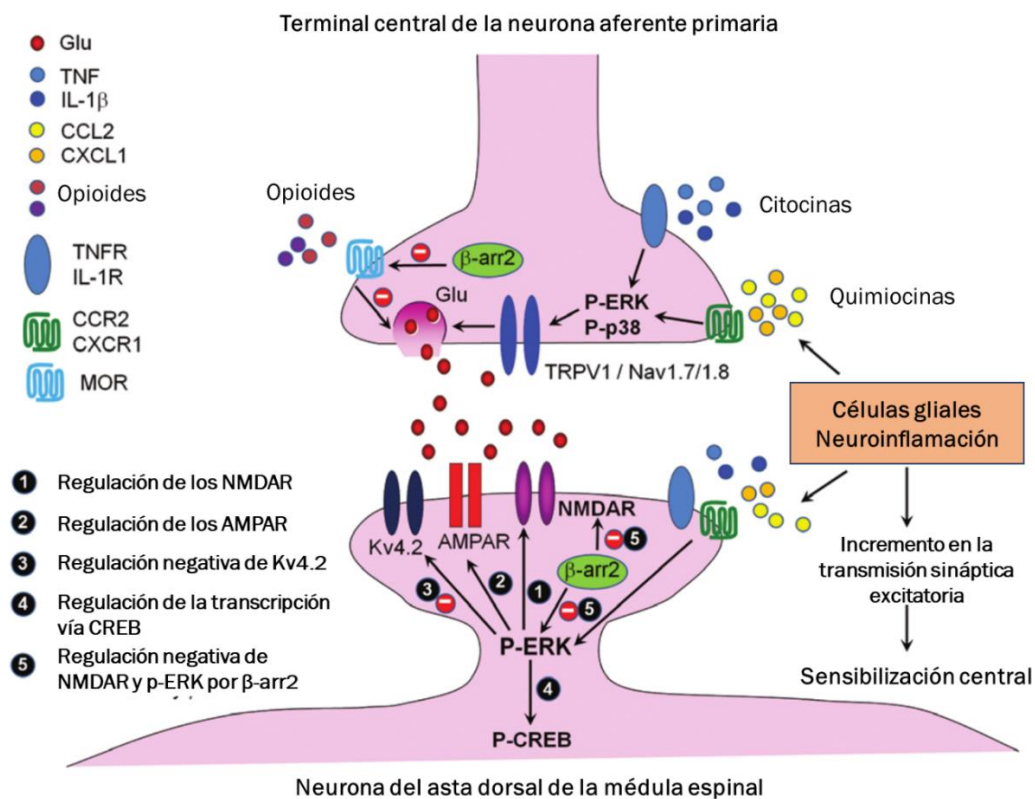


Figura 5. Sensibilización central. El aumento en la actividad de las fibras aferentes primarias permite la liberación de neurotransmisores, como glutamato, de la terminal central hacia las neuronas de segundo orden en la médula espinal. El glutamato actúa sobre los receptores NMDA y AMPA, que incrementa el influjo de Ca^{2+} , lo que permite un incremento de la excitabilidad de la neurona del asta dorsal. La microglía y los astrocitos también participan en la hiperexcitabilidad incrementando los niveles de mediadores proinflamatorios que aumentan la liberación de glutamato en la neurona presináptica, mientras que sensibilizan a la neurona postsináptica. Modificado de Ji et al., 2018.

En condiciones normales, la activación de los receptores GABA_A disminuye la excitabilidad neuronal por dos mecanismos: la hiperpolarización de la membrana postsináptica y/o la generación de un corto circuito de la membrana presináptica, disminuyendo la liberación de neurotransmisores excitadores. Estos cambios producidos en la excitabilidad neuronal dependen del gradiente de cloruro (Cl⁻), el cual es el principal ion transportado a través de los receptores GABA, cuyos niveles intracelulares regulan el grado de inhibición de la actividad neuronal (Price et al., 2009; Bardoni et al., 2013; Prescott, 2015).

En las aferentes primarias los niveles del ion cloruro están regulados por un cotransportador de iones Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 1 (NKCC1), el cual permite la entrada de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ al interior de las neuronas y mantiene una concentración alta (por encima del potencial electroquímico) de cloruro intracelular. De manera contraria, en las neuronas de segundo orden el cotransportador de K⁺-Cl⁻ 2 (KCC2) transporta los iones K⁺ y Cl⁻ al exterior de la célula lo que mantiene niveles bajos de cloruro intracelular. La activación de los receptores GABA_A en las neuronas sensoriales primarias permite la salida de Cl⁻ produciendo una despolarización conocida como despolarización de la aferente primaria (DAP). Esta despolarización reduce la transmisión nociceptiva ya que atenúa la magnitud de los potenciales de acción, por lo que disminuye la liberación de neurotransmisores excitadores en las terminales centrales de las aferentes primarias. En el caso de las neuronas de segundo orden, la activación de los receptores GABA_A permite la entrada de Cl⁻ lo que resulta en hiperpolarización, traducido como una inhibición de la excitabilidad (**Figura 6**) (Price et al., 2005; Price y Prescott, 2015; Javdani et al., 2020; Virtanen et al., 2020).

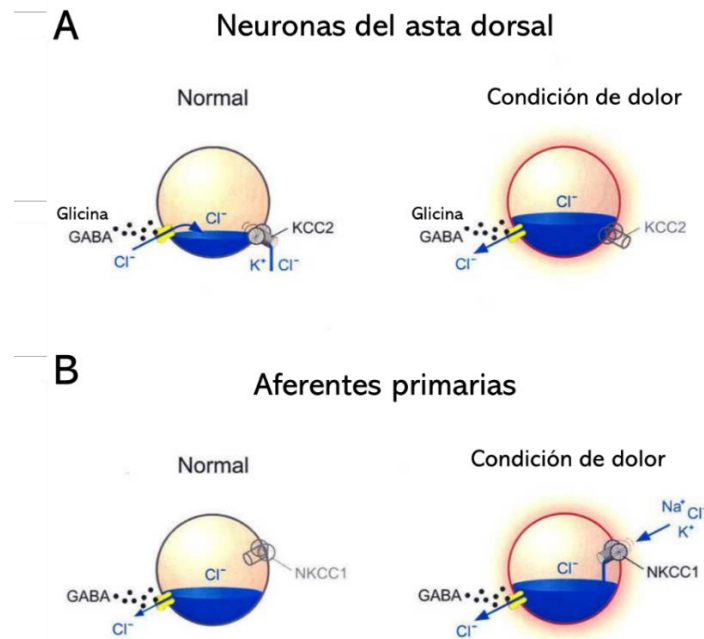


Figura 6. Desinhibición GABAérgica. A) La salida de Cl^- a través de KCC2 mantiene el carácter hiperpolarizante en las neuronas del asta dorsal. Al disminuir la expresión de KCC2 en condiciones patológicas ocasiona la acumulación de cloruro intracelular debido a la inversión del potencial aniónico de los receptores GABA_A . B) En fibras aferentes primarias, el receptor GABA_A al ser activado genera corrientes despolarizantes que son mantenidas por el NKCC1. Al presentarse un aumento en la expresión de NKCC1 genera una acumulación de Cl^- intracelular que genera una despolarización mejorada regulada por el GABA_A . Modificado de Price et al., 2005.

En condiciones de dolor patológico se genera un proceso de desinhibición, el cual implica la pérdida de los mecanismos inhibitorios de la transmisión nociceptiva, lo que favorece el paso de la información sensorial a centros superiores del SNC. En este sentido, se sabe que ocurre un aumento de la expresión y la actividad del cotransportador NKCC1 en las aferentes primarias. Esto genera un incremento en los niveles de Cl^- intracelular y que, al activarse los receptores GABA_A se produce una salida masiva de Cl^- generando un gran número de DAPs lo que permite alcanzar el umbral de disparo de potenciales de acción dando lugar a los reflejos de la raíz dorsal (RRD). Con respecto al KCC2, en condiciones dolorosas su expresión disminuye. Esto permite la acumulación de Cl^- intracelular. Por lo tanto, la activación de los receptores GABA_A facilita la salida de Cl^- lo que reduce su capacidad de inhibir la transmisión nociceptiva (Price et al., 2009; Módol et al., 2014; Lau y Vaughan, 2014; Price y Prescott, 2015).

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Fibromialgia

La fibromialgia es un síndrome de dolor musculoesquelético que se caracteriza por dolor crónico generalizado, fatiga, sueño, cambios de humor y trastornos cognitivos (Häuser, 2017; Bazzichi, 2020). Esta enfermedad afecta a entre el 2% y 8% de la población mundial, con una marcada predominancia hacia las mujeres con una relación de 2 a 1 respecto a los hombres (Clauw, 2014). El Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés) define a la fibromialgia con base en dos criterios característicos: el primero es la presencia de dolor crónico generalizado y espontáneo por un periodo continuo de 3 meses, mientras que el segundo criterio es la sensibilidad ante presión táctil en por lo menos 11 de 18 “puntos sensibles” (Wolfe et al., 1990). Actualmente, los criterios diagnósticos incluyen el reconocimiento de problemas cognitivos y síntomas somáticos, factores que no eran considerados en la definición de 1990 del ACR (Dedhia, 2009; Wolfe, 2010) (**Figura 7**). El diagnóstico de la fibromialgia es por exclusión. Se realiza tomando en cuenta la historia médica del paciente, la evaluación de los síntomas que presenta, generando una investigación y el descarte de otras causas que llevan a síntomas similares a los de la fibromialgia. A pesar de que la etiología de la enfermedad aún no está clara, se han analizado diversos factores genéticos, ambientales, hormonales y neurales como posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de la fibromialgia (Coskun-Benlidayi, 2019).

La fibromialgia reduce de manera considerable la calidad de vida de las personas que la padecen. Es por esto por lo que la investigación se ha enfocado en tratar de entender cuáles son los mecanismos que subyacen a la enfermedad y así, tratar de mejorar la calidad de vida en estos pacientes. Los mecanismos propuestos son: 1) la desregulación del sistema nervioso central, periférico y autónomo que promueve la amplificación de la transmisión del dolor y de su interpretación a nivel cortical; 2) la disfunción neuroendocrina como respuesta al estrés mediado por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal; 3) las alteraciones en la función del sistema inmune; 4) la disfunción del metabolismo muscular por alteraciones del estrés oxidativo a nivel mitocondrial; y 5) la predisposición genética (Iqbal, 2011; Covarrubias-Gómez y Carrillo-Torres, 2016).

Índice de dolor generalizado
(1 punto por 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.

Marca en el diagrama las casillas para cada área en donde se haya tenido dolor o sensibilidad.

Severidad de los síntomas
(Rango: 0-12 puntos)

2 Para cada síntoma listado a continuación, utilice la siguiente escala para indicar la severidad de cada uno **durante los últimos 7 días**.

- **Ningún problema**
- **Problema ligero o leve:** generalmente leve o intermitente
- **Problema moderado:** problemas considerables; presente muy seguido y/o a un nivel moderado
- **Problema severo:** continuo, afecta la calidad de vida

| | Ningún problema | Problema ligero o 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 | <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 el 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 presentados en las preguntas 2 y 3, y el dolor generalizado, ¿se han presentado a un nivel similar durante **al menos 3 meses**?

No Sí

5 ¿Usted tiene algún trastorno que pueda explicar el dolor?

No Sí

Figura 7. Criterios para el diagnóstico de la fibromialgia. La puntuación posible oscila entre 0 y 31 puntos; una puntuación mayor o igual a 13 puntos es compatible con un diagnóstico de fibromialgia. Modificado de Clauw, 2014.

La sensibilización central ha surgido como una hipótesis importante en la explicación de la patogénesis de la fibromialgia, lo cual sugiere que el SNC tiene un papel importante en el aumento o la amplificación del dolor y en el desarrollo de comorbilidades como depresión, trastornos del sueño y del estado de ánimo, fatiga y problemas de memoria (Häuser, 2015). Las concentraciones de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) están reducidas en el líquido cefalorraquídeo y en el suero de los pacientes con fibromialgia (Russell et al., 1992). Además, se ha observado que en pacientes con fibromialgia los niveles de opioides endógenos, como las encefalinas, están aumentados en el LCR y se presenta una disminución en la disponibilidad de los receptores a opioides a nivel central (Baraniuk et al., 2004; Harris et al., 2007; Sluka y Clauw, 2016).

Por otra parte, los niveles de glutamato se han visto incrementados en LCR y en áreas cerebrales involucradas en el procesamiento del dolor, como la ínsula, lo que sugiere

que el aumento de la transmisión excitatoria contribuye al mantenimiento de la sensibilización central en la fibromialgia (Sarchielli, 2007; Häuser, 2015).

Además de los factores ya mencionados, existe evidencia de que las alteraciones inmunológicas pueden llevar a un estado inflamatorio que contribuye a la hipersensibilidad en la fibromialgia. Las citocinas y los factores neurotróficos modifican las interacciones neuroinmunológicas a nivel periférico y la neuroinflamación en médula espinal y cerebro (Coskun-Benlidayi, 2019). Un incremento en la concentración del NGF en el LCR sugiere una posible participación de neuropéptidos en la patología de la fibromialgia (Giovengo et al., 1999). Aunado a esto, los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del glutamato están elevados en pacientes con fibromialgia, lo que sugiere una posible participación del NGF como mediador en la regulación del BDNF en este padecimiento (Sarchielli et al., 2007; Bjurstrom et al., 2016).

Se cree que existe un desbalance entre citocinas pro- y anti-inflamatorias en este síndrome. Wang y colaboradores encontraron niveles elevados de interleucina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral (TNF), pero no de IL-6, en suero de pacientes con fibromialgia (Wang et al., 2008). Por su parte, Kadetoff y colaboradores encontraron concentraciones elevadas de IL-8 en suero y LCR de pacientes con fibromialgia. Lo anterior contribuye a la hipótesis de la activación de la glía en síndromes de dolor crónico (Kadetoff et al., 2012). Contrario a lo visto por Wang y colaboradores, se ha encontrado un aumento simultáneo de IL-6 e IL-8 en pacientes con fibromialgia, lo que sugiere un efecto sinérgico en el dolor persistente experimentado por dichos pacientes (Mendieta, 2016). La IL-17A, producida principalmente por linfocitos, *natural killers* (NK), células dendríticas y neutrófilos, está aumentada en pacientes con fibromialgia y se encontró una correlación con las citocinas proinflamatorias, como IL-2, interferón- γ (INF- γ) y TNF, y anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 (Pernambuco et al., 2013). Otra citocina pro-inflamatoria que participa en procesos de dolor crónico es la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1). La secreción activa de esta proteína se induce por citocinas como TNF, IL-1, óxido nítrico (NO) y neuropéptido Y (Wang, 1999; Zhou, 2013). La HMGB1 modula la actividad de las células gliales y de las neuronas (Agalave, 2014; Kisaoka-Nakashima, 2019). Asimismo, el aumento en los niveles en

suero de la HMGB1 se ha relacionado con el grado de fatiga y dolor de los pacientes con fibromialgia (Oktayoglu et al., 2013).

2.1.1 Farmacología de la fibromialgia

El tratamiento de la fibromialgia se enfoca en el control de los síntomas. Los antidepresivos tricíclicos (amitriptilina o imipramina), los inhibidores de la recaptura de serotonina/noradrenalina (duloxetina) y los fármacos antiepilépticos (gabapentina y pregabalina) se encuentran entre los fármacos más utilizados para su tratamiento (**Tabla 1**). Los antagonistas de receptores a opioides como la naltrexona, a dosis bajas, funcionan como tratamiento para la disminución de la hiperactividad del sistema de opioides endógenos en pacientes con fibromialgia. Asimismo, el ejercicio y la terapia cognitivo-conductual son recomendados para la recuperación de los patrones de sueño y la disminución del estrés (Dedhia, 2009; Clauw, 2014; Crabtree, 2016).

Tabla 1. Tratamientos farmacológicos de la fibromialgia (FM).

| Tipo de mecanismo | Fármaco | Efecto en pacientes con FM | Evidencia de calidad |
|---|---------------|--|--|
| Antidepresivo tricíclico | Amitriptilina | Mejora del dolor, la fatiga y las anomalías del sueño | Ensayos controlados aleatorizados. Recomendado en las guías (Carville et al., 2008; Häuser et al., 2008; Fitzcharles et al., 2013) |
| Inhibidor de la recaptura de 5-HT y NA | Duloxetina | Mejora del dolor y la depresión | Ensayos controlados aleatorizados y meta-análisis (Calandre et al., 2015; Häuser et al., 2018) |
| | Milnacipran | Mejora en el dolor y la fatiga | |
| Inhibidor selectivo de la recaptura de NA | Reboxetina | Mejora en el dolor | Mayoritariamente reportes de casos (Krell et al., 2015) |
| | Esreboxetina | Mejora en el dolor y la fatiga | Ensayos controlados aleatorizados (Arnold et al., 2012) |
| Inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT | Citalopram | Mejora en el dolor y la depresión | Ensayos controlados aleatorizados y meta-análisis. Recomendando en las guías (Carville et al., 2008; Häuser et al., 2008; Fitzcharles et al., 2013; Häuser et al., 2018) |
| | Escitalopram | | |
| | Fluoxetina | | |
| | Paroxetina | | |
| Gabapentinoides | Pregabalina | Mejora del dolor, la fatiga y las anomalías del sueño | Ensayos controlados aleatorizados. Recomendado en las guías (Crofford et al., 2005; Häuser et al., 2009; Ohta et al., 2012; Ablin et al., 2013) |
| | Gabapentina | Efectivo en modelos animales. No hay evidencia clara en pacientes con FM | Ensayos controlados aleatorizados (Heam et al., 2012) |
| | Lacosamida | | |
| Antagonista de receptores opioides | Naltrexona | Mejora del dolor y la depresión | Ensayos controlados aleatorizados (Younger et al., 2009; Younger et al., 2013) |
| Cannabinoides | Nabilona | Mejora del dolor y la ansiedad* | Ensayos controlados aleatorizados y meta-análisis (Skrabek et al., 2008; Ware et al., 2010; Walitt et al., 2016) |
| | Dronabinol | Mejora en el dolor y la depresión* | Ensayos controlados aleatorizados y meta-análisis (Weber et al., 2009) |
| Antagonistas NMDA | Ketamina | Mejora del dolor referido | Ensayos clínicos y preclínicos (Cohen et al., 2006) |
| | Memantina | Mejora del dolor* | Ensayos controlados aleatorizados y meta-análisis (Johnson et al., 2006; Harris et al., 2009) |

*Evidencia contradictoria, ver referencias. Modificado de Tzadok y Ablin, 2020.

2.2 Modelos de fibromialgia

Los modelos animales son herramientas importantes para el desarrollo de nuevos tratamientos y la investigación de los mecanismos que subyacen a una enfermedad (DeSantana, 2013). La necesidad de esclarecer la fisiopatología que subyace a la fibromialgia, así como el progreso en la eficacia de nuevas y mejores terapias, ha llevado al desarrollo de modelos animales que logren mimetizar los síntomas de pacientes con este síndrome. Los modelos animales de fibromialgia como el de inyección repetida de solución salina ácida (Sluka et al., 2001), el de hiperalgesia potenciada por ejercicio (Gregory et al., 2013), el de estrés intermitente al frío (Nishiyori y Ueda, 2008), el de estrés por nado subcrónico (Quintero et al., 2000), o el de mialgia inducida por reserpina (Nagakura, 2009) representan algunas de las características clínicas de la fibromialgia, manifestando alodinia generalizada y de larga duración sin daño aparente a los tejidos (Nagakura, 2017). A pesar de estas similitudes, los cambios que ocurren en el sistema nervioso central y periférico son diferentes en cada modelo (DeSantana, 2013). En la **Tabla 2** se muestran hallazgos relevantes en los principales modelos animales de fibromialgia, con excepción del modelo de fibromialgia inducido por reserpina que se describe en la siguiente sección.

Tabla 2. Modelos animales de fibromialgia y sus principales hallazgos. Modificado de Nagakura, 2017.

| Modelos animales | Hallazgos principales | |
|---|--|---|
| | Fisiopatología periférica | Fisiopatología central |
| Solución salina ácida Dos inyecciones de salina ácida en el músculo gastrocnemio (Sluka, 2001). | Aumento en la actividad de canales de sodio dependientes de voltaje insensibles a TTX por la activación de los canales ASIC3 en nociceptores musculares (Chen et al., 2014). | Hiperalgesia mecánica generalizada y de larga duración (Sluka, 2001). Conductas tipo ansiedad fueron detectadas en las pruebas de campo abierto y de laberinto elevado (Liu et al., 2014). |

| Modelos animales | Hallazgos principales | |
|--|--|---|
| | Fisiopatología periférica | Fisiopatología central |
| | La hiperalgesia articular se previene con un pretratamiento con inhibidores de los ASIC3 (Sugimura et al., 2015). | |
| <p>Hiperalgesia inducida por ejercicio</p> <p>Combinación de ejercicio y la inyección de solución salina ácida (Gregory, 2013).</p> | <p>El desarrollo de hiperalgesia se previene con la administración de un inhibidor de ASIC3 y de macrófagos, pero no con la deleción de ASIC3 en las aferentes primarias (Gregory et al., 2016).</p> <p>El bloqueo de los receptores P2X4 en el músculo previene el desarrollo de hiperalgesia, al igual que la desregulación de los P2X4 en los macrófagos musculares (Oliveira-Fusaro et al., 2020).</p> | <p>Hiperalgesia muscular unilateral y de corta duración en machos, mientras que en hembras se presenta bilateral y de larga duración; las hembras presentan mayor sensibilidad, la cual no se ve afectada con la ovariectomía (Gregory et al., 2013).</p> |
| <p>Estrés intermitente al frío</p> <p>Exposición intermitente al frío (Nishiyori y Ueda, 2008).</p> | <p>La respuesta inflamatoria producida con el LPS se incrementa, en cultivo de macrófagos, después de la exposición al estrés (Montserrat-de la Paz et al., 2015).</p> <p>Se detectaron cambios morfológicos en el músculo gastrocnemio de ratones en ambos sexos (Bonaterra et al., 2016).</p> | <p>Analgesia producida con la administración intracerebroventricular de gabapentina (Nishiyori y Ueda, 2008).</p> <p>Ausencia de analgesia por la administración de morfina, posiblemente por la perdida en la activación de las vías descendentes serotoninérgicas (Nishiyori et al., 2010).</p> |

| Modelos animales | Hallazgos principales | |
|--|---|--|
| | Fisiopatología periférica | Fisiopatología central |
| | El desarrollo de alodinia muscular, pero no de hiperalgesia, dependiente de los canales ASIC3 (Hsu et al., 2019). | Aumento de la concentración sérica de corticosterona; conducta revertida con la administración de antidepresivos (Lee et al., 2017). |
| <p>Estrés por nado subcrónico</p> <p>Prueba de nado forzado en repetidas ocasiones (Quintero et al., 2000).</p> | | <p>Inducción de hiperalgesia térmica; la hiperalgesia se revierte con inhibidores de la recaptura de serotonina, antidepresivos tricíclicos y triptófano (Quintero et al., 2000).</p> <p>Incremento de c-Fos en la médula espinal en la prueba de formalina (Quintero et al., 2003).</p> <p>Aumento en la expresión de c-FOS y p-CREB en la corteza insular y en la corteza del cíngulo anterior en la prueba con el adyuvante completo de Freund (Imbe et al., 2014).</p> |

| Modelos animales | Hallazgos principales | |
|--|---------------------------|---|
| | Fisiopatología periférica | Fisiopatología central |
| | | <p>Potenciación de la hiperalgesia mecánica en la prueba con CFA; disminución de la acetilación de la histona H3 en la corteza insular (Imbe y Kimura, 2015).</p> <p>Incremento en la hiperalgesia térmica y en las conductas tipo depresión por atenuación del tono catecolaminérgico, únicamente en las hembras (Zhang et al., 2020).</p> |
| <p>Estrés por inmersión en agua</p> <p>Alojamiento en condiciones de inmersión en agua (Tanaka et al., 2003).</p> | | <p>Activación de la microglía; atenuación de la hiperalgesia y la alodinia con la administración de minociclina (Yasui et al., 2014).</p> <p>Incremento global en los niveles de glutamato en el cerebro (Li et al., 2020).</p> |

2.2.1 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina

En los pacientes con fibromialgia se ha visto una disminución en los niveles de aminas biogénicas como DA, 5-HT y NA. Este desbalance podría ser un mecanismo que explique la fisiopatología de la enfermedad. El modelo de fibromialgia inducido por reserpina se caracteriza por la inducción de hiperalgesia muscular y alodinia táctil generalizadas ante la administración subcutánea de reserpina (1 mg/kg por 3 días). Se considera que estos efectos sobre la sensibilidad se producen por la depleción de aminas biogénicas en la medula espinal, el tálamo y la corteza prefrontal (Nagakura et al., 2009).

La hiperalgesia en este modelo está dada por mecanismos periféricos y centrales (**Figura 8**), de acuerdo con lo observado por Taguchi y colaboradores en 2015. En este estudio, demostraron la activación de la microglía en la médula espinal y el aumento en la expresión de los canales sensibles a ácido 3 (ASIC3) en las neuronas del GRD. Asimismo, en un estudio reciente realizado por De la Luz-Cuellar y colaboradores, se observó la pérdida de la inhibición GABAérgica dada por los receptores GABA_{A-α5}. Estos son otros mecanismos que contribuyen a la hipersensibilidad generada en este modelo (Taguchi et al., 2015; De la Luz-Cuellar et al., 2019).

La alodinia mecánica inducida por reserpina se reduce con la administración de anticonvulsivantes, inhibidores de la recaptura de NA/5-HT y agonistas dopaminérgicos, pero no con antiinflamatorios no esteroideos, lo que se asemeja al manejo de pacientes con dolor neuropático (Nagakura et al., 2009; Nagakura, 2017; DeSantana, 2013).

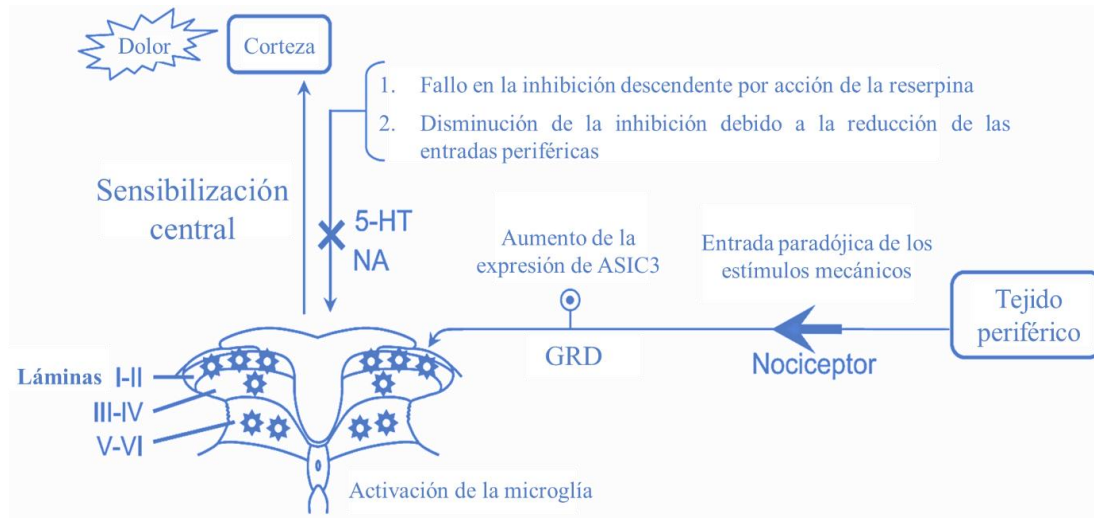


Figura 8. Mecanismos propuestos en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. A nivel periférico ocurre una disminución de la proporción de nociceptores que responden a estímulos mecánicos junto con un incremento de la magnitud de dichas respuestas. Estos cambios paradójicos podrían contribuir a un mal funcionamiento en el sistema de inhibición descendente, lo que resulta en la intensificación del dolor. El ARNm de los canales ASIC3 se sobreexpresa en el GRD. 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. Estos mecanismos, tanto periféricos como centrales, contribuyen al desarrollo de las conductas nociceptivas en este modelo. Modificado de Taguchi et al., 2015.

2.3 La alarmina HMGB1

La familia de proteínas de alta movilidad (HMGB) es un grupo de proteínas cromosómicas no-histonas, ampliamente distribuidas en el núcleo de las células que facilitan la transcripción de genes. Este grupo está compuesto por cuatro tipos de proteínas: HMGB1, HMGB2, HMGB3 y HMGB4. De manera específica, la proteína HMGB1 es el prototipo de una clase de mediadores inflamatorios denominados alarminas. Las alarminas alertan al sistema inmune de la presencia de daño a los tejidos y al estimularlo permite tener una respuesta inmediata. La HMGB1 es la alarmina mejor caracterizada, fue descrita inicialmente por Goodwin y Johns en 1973 mediante electroforesis y forma parte de un grupo de proteínas de unión a la cromatina (Goodwin y Johns, 1973). Esta alarmina contiene una cadena polipeptídica sencilla de 215 aminoácidos con dos dominios globulares N-terminal de unión al DNA (HMG caja A y caja B) y un dominio ácido C-terminal (Nogueira-Machado, 2011). Tanto la caja A como la B contienen un alto número de residuos de lisina cargados positivamente que permiten la unión de la HMGB1 con el surco menor del ADN. Por su parte, la cola C-

terminal está formada por, aproximadamente, 30 residuos continuos de ácido glutámico y ácido aspártico cargados negativamente. Fue debido a esta distribución de cargas, que inicialmente se le nombró como anfoterina (Merenmies et al., 1991).

Esta molécula puede liberarse de manera pasiva en respuesta a procesos de necrosis, apoptosis o daño celular, o puede ser secretada de manera activa en macrófagos o monocitos activados, células dendríticas, NK o células epiteliales, en donde participa como patrón molecular asociado a daño (DAMP) (Nogueira-Machado, 2011; Agalave, 2014).

La liberación de HMGB1 de la células del sistema inmune se puede dar por dos mecanismos:

- El primer mecanismo requiere de la traslocación de la alarmina al citoplasma. Para que esto ocurra se requiere de la activación de la vía de señalización JAK/STAT, lo que genera un aumento en los niveles de acetilación producidos en las secuencias de localización nuclear (NLS). Esta hiperacetilación permite la acumulación de HMGB1 en el citoplasma, la cual es empaquetada y liberada por vesículas secretoras, similares a las de la familia de interleucina-1 (Gardella et al., 2002; Lou et al., 2014).
- El segundo mecanismo no requiere de la acetilación de las NSL. La liberación por este mecanismo se da gracias a la ruptura de la membrana celular en procesos de muerte celular. La forma no acetilada de la HMGB1 es un mediador de procesos inflamatorios (Kang et al., 2014).

La liberación de HMGB1, por ambos mecanismos, promueve la activación de vías de señalización que permiten el aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF, IL-1, IL-6 o IL-8.

2.3.1 HMGB1 y la unión a receptores

Tras la liberación de HMGB1 al espacio extracelular, se inician respuestas inflamatorias gracias a su unión con diferentes receptores. La capacidad que tiene la alarmina para unirse a sus receptores depende de las diferentes isoformas funcionales de HMGB1, las cuales cambian con base en el estado de oxidación de tres residuos de cisteína (C23, C45 y C106) (**Figura 9**).

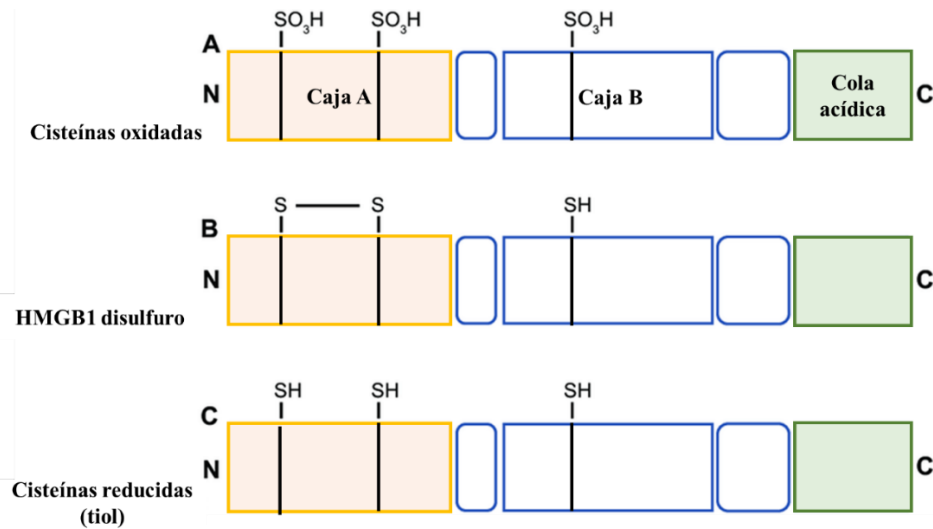


Figura 9. Estructura y estados de oxidación de HMGB1. A) HMGB1 consta de 3 dominios: dos de unión al ADN (Caja A y caja B) y una cola ácida C-terminal. Cuando los residuos de cisteína se encuentran oxidados la alarmina pierde su función como mediador inmunológico. B) La forma disulfuro de HMGB1 tiene un puente disulfuro entre las cisteínas 23 y 45, mientras que la C106 contiene un grupo tiol. Esta isoforma promueve la liberación de citocinas. C) La forma reducida de HMGB1 se forma con grupos tiol en las cisteínas C23, C45 y C106. Esta se localiza en el citoplasma y en la región extracelular, en donde promueve la quimiotaxis. Modificado de Martinotti et al., 2015.

A la fecha, se han identificado 14 receptores blanco de la alarmina HMGB1. Los de mayor importancia en el desarrollo de procesos inflamatorios son los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), principalmente los receptores de productos de glicosilación avanzada (RAGE) y los receptores tipo Toll (TLR) (Klune, 2008; Shah, 2018).

El RAGE fue el primer receptor identificado capaz de unir HMGB1. La interacción entre HMGB1 y RAGE resulta en la activación del factor de transcripción $\text{NF}\kappa\text{B}$, seguido de la inducción de quimiotaxis en diversos tipos celulares como los neutrófilos o las células dendríticas (Hori et al., 1995; Yang et al., 2007; LeBlanc et al., 2014).

Por otra parte, la interacción entre la proteína HMGB1 y los receptores TLR depende del estado de oxido-reducción de la alarmina. La forma disulfuro de la HMGB1 activa al TLR4, lo que induce varias cascadas de señalización como las dependientes de ERK1/2, JNK, IKK, y p38. Lo anterior culmina en la traslocación al núcleo de $\text{NF}\kappa\text{B}$ y la consecuente liberación de mediadores proinflamatorios. De igual forma, se ha visto que HMGB1 activa otros receptores tipo Toll, como el TLR2 y el TLR5 (Agalave et al., 2014).

2.4 Receptores tipo Toll

Los TLRs son receptores transmembranales tipo 1, los cuales presentan homología con la proteína Toll de *Drosophila* y el receptor de la IL-1 (IL-1R) (**Figura 10**). La región extracelular de los TLR contiene motivos repetidos ricos en leucina (LRR), a diferencia de los IL-1R que expresan dominios tipo inmunoglobulinas. Estos LRRs consisten en secuencias de 24 a 29 aminoácidos repetidos en tándem y tienen una estructura en forma de herradura de caballo. La superficie cóncava de esta estructura está involucrada directamente en el reconocimiento de patógenos. La región intracelular los TLR cuenta con una secuencia, altamente conservada, de aproximadamente 200 aminoácidos conocida como dominio Toll/IL-1R (TIR). Este dominio contiene tres regiones conservadas que son esenciales para la señalización de estos receptores (Akira y Takeda, 2004).

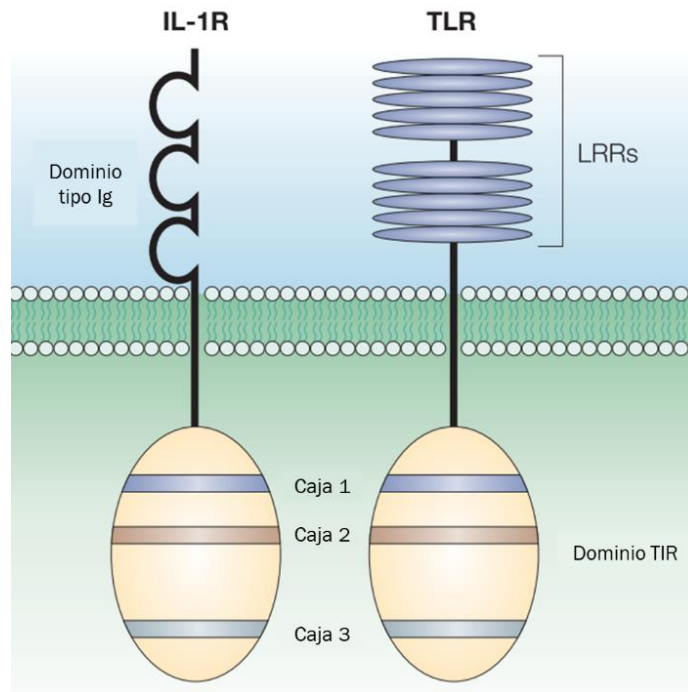


Figura 10. Estructura de los TLR. Los receptores tipo Toll (TLRs) y los receptores a interleucina-1 (IL-1Rs) tienen un dominio citoplasmático conservado, conocido como dominio TIR. Este dominio se caracteriza por la presencia de tres regiones homologas (conocidas como caja 1, caja 2 y caja 3). A pesar de la similitud que tienen sus dominios citoplasmáticos, la región extracelular difiere de manera importante: los TLRs tienen regiones repetidas ricas en leucina (LRRs), mientras que los IL-1Rs contienen tres dominios de inmunoglobulina g. Modificado de Akira y Takeda, 2004.

En la actualidad se han descrito 11 tipos de TLR que pueden desencadenar respuestas de inmunidad innata o adaptativa (Aravalli, 2007). Los TLRs son una familia de receptores, que detectan la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y a daño (DAMP) (Das, 2016). Los miembros de esta familia comparten estructuras similares, sin embargo, difieren entre ellas en la especificidad que tienen por un ligando, en la expresión de patrones e incluso en las vías de señalización que activan (van Beijnum, 2008). La unión de un ligando a estos receptores promueve la formación de dímeros y de cambios conformacionales que les permiten reclutar a moléculas de señalización intracelular y desencadenar procesos inflamatorios.

2.4.1 El TLR5 y su papel en el dolor

Dentro de la familia de los TLRs, se encuentra el subtipo TLR5. Este receptor se caracteriza por reconocer de manera específica a la flagelina, la proteína más importante de carácter estructural del flagelo bacteriano. La activación de este receptor moviliza al factor de transcripción NF κ B, mediante la vía de señalización dependiente de MyD88, y estimula la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de otras citocinas proinflamatorias.

El TLR5 se expresa de manera constitutiva en células epiteliales y del sistema inmune, principalmente en monocitos y células dendríticas inmaduras. De manera similar, en la región apical del epitelio respiratorio se expresa el TLR5, lo que permite tener una respuesta temprana de la inmunidad innata ante infecciones respiratorias, como las producidas por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. De manera interesante, la expresión del TLR5 en el tracto gastrointestinal se da principalmente en la región basolateral del epitelio, lo que permite reconocer a las bacterias que lo hayan atravesado. Asimismo, el reconocimiento de la flagelina en la mucosa intestinal funciona como control de la microbiota, previniendo enfermedades asociadas con procesos inflamatorios en el intestino (Hayashi et al., 2001; Yang y Yan, 2017).

Actualmente ya se conocen los mecanismos de amplificación de las señales dolorosas producidos por los receptores TLR2 y TLR4 en las aferentes primarias y en la médula espinal (Tanga et al., 2005; Kim et al., 2007; Lacagnina, 2018). Sin embargo, el papel que desempeñan los TLR5 en el dolor no ha sido tan estudiado en comparación con los

otros receptores TLR. Se ha visto que el TLR5 tiene un papel importante en el desarrollo de conductas nociceptivas. Xu y colaboradores, en un estudio reciente, observaron que el TLR5 se expresa en los cuerpos neuronales y en las terminales centrales y periféricas de las aferentes primarias, específicamente en las fibras A β . Asimismo, vieron que la activación de los TLR5 en las fibras A β permite la entrada a la neurona de moléculas derivadas de la lidocaína, lo que revierte la alodinia mecánica producida por la administración de agentes quimioterapéuticos y por daño a los nervios (Xu et al., 2015).

2.5 EL RAGE

Los RAGE son proteínas transmembranales tipo I, compuestos de un dominio transmembranal único, una porción citosólica y una región extracelular que consiste en 2 dominios de inmunoglobulina tipo C (C1 y C2) y un dominio tipo V, considerado como el sitio principal de unión a los ligandos (Sims, 2010). El papel que desempeñan los RAGE como receptores de reconocimiento de patrones involucrados en la respuesta inflamatoria es similar al de los TLR.

Aunque inicialmente se describió como el receptor de unión de los productos finales de glicación avanzada (AGE), en la actualidad se sabe que une una gran diversidad de ligandos diferentes entre los que se incluyen a la proteína HMGB1 (Nogueira-Machado, 2011) (**Figura 11**). La unión de ligandos a RAGE puede activar dos vías de señalización importantes, una que abarca CDC42/Rac y otra que incluye una familia diversa de MAPK que desencadenan la actividad transcripcional dependiente de NF κ B (Lander et al., 1997; Huttunen, 1999). Se sabe que la activación de estos receptores por HMGB1 involucra la estimulación de ambas vías de señalización: al activar CDC42 y Rac1 permite cambios en el citoesqueleto y crecimiento de neuritas, mientras que con la activación de p38 MAPK y Erk1/2 inicia la transcripción de genes, mediada por NF κ B, que están involucrados en la adhesión celular y la producción de citocinas (Huttunen, 2004; Rouhiainen, 2013).

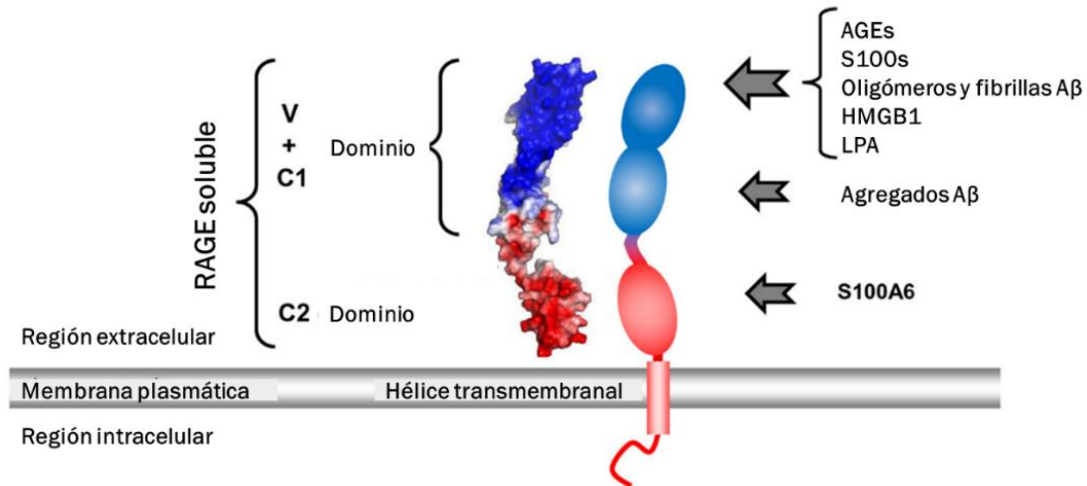


Figura 11. Estructura de RAGE y sus ligandos. El ectodominio de RAGE está compuesto por tres dominios Ig: V, C1 y C2. El receptor está anclado en la membrana plasmática por una única hélice transmembranal y presenta en el citoplasma una cola C-terminal no estructurada. La superficie está coloreada según la carga electrostática; las áreas con carga positiva se representan en azul, y las áreas con carga negativa se representan en rojo. Los dominios V y C1 forman una unidad estructural y tienen una carga superficial positiva en contraste con el dominio C2, que tiene carga negativa. La mayoría de los ligandos reportados hasta ahora se unen al dominio V de RAGE. Modificado de Kierdorf y Fritz, 2013.

2.5.1 El RAGE y el dolor

El RAGE forma un sistema de señalización complejo que ha sido asociado a la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes y de varios tipos de cáncer. Además, se ha visto que este receptor tiene un papel importante en el desarrollo de hiperexcitabilidad de las neuronas sensoriales y de conductas dolorosas. Los RAGE se expresan en una gran variedad de tejidos, incluyendo las vías sensoriales periféricas como en el GRD, en donde se ha asociado con la activación del sistema inmune a consecuencia de daño a los nervios (Rong, 2004). En neuronas del GRD se ha visto un aumento en la expresión de RAGE seguido por un aumento en la expresión del factor de transcripción NFκB y de la interleucina-1β en modelos de daño a los nervios (Li et al., 2016). Asimismo, la activación de los RAGE por AGEs en neuronas del GRD resulta en el aumento del estrés oxidativo y de la apoptosis. Esto genera un desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno lo que contribuye de manera importante en el desarrollo de dolor crónico (Vincent, 2007; Maeda, 2013).

Por otro lado, la supresión espinal de la vía RAGE-NF- κ B en ratas diabéticas alivia parcialmente el dolor, lo que sugiere que el RAGE contribuye con los mecanismos que subyacen al dolor neuropático (Zhang, 2020). De manera similar, el grupo de Wei y colaboradores observaron que la activación de la vía de señalización RAGE/STAT3 en el asta dorsal contribuye al desarrollo de sensibilización central y de alodinia mecánica en el dolor persistente inducido por fármacos antineoplásicos como el bortezomib (Wei et al., 2017). De igual forma, el bloqueo de los RAGE con un anticuerpo monoclonal de alta afinidad ha demostrado ser efectivo en la atenuación de la excitación de nervios periféricos y en la disminución de la nocicepción en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Brederson, 2016; Bestall, 2018).

2.6 HMGB1, TLR5 y RAGE en el dolor

De manera interesante, se ha visto que la proteína HMGB1 tiene un papel pronociceptivo en el desarrollo de diversos tipos de dolor, como en el visceral, somático, inflamatorio y neuropático (Agalave et al., 2014; Tanaka et al., 2014; Thakur, 2020). Shibasaki y colaboradores demostraron que el daño a los nervios induce la liberación de HMGB1 en neuronas periféricas y esto contribuye al desarrollo de hipersensibilidad al dolor (Shibasaki et al., 2010). Asimismo, la diabetes tipo 2 induce alodinia mecánica y aumento de los niveles de HMGB1 en la médula espinal (Ren, 2012). También, se ha demostrado que la proteína HMGB1 a través de la activación de TLRs y RAGE en las neuronas del GRD participan en el desarrollo de dolor crónico (Maeda, 2013). La activación de los TLR y RAGE en las células gliales e inmunológicas que se encuentran cercanas a los nociceptores, tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP), facilita de manera directa la transmisión del dolor (Agalave, 2014).

El TLR5 al ser activado por HMGB1 inicia una cascada de señalización dependiente de la proteína MyD88, la cual permite la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF κ B y desencadena la transcripción y liberación de citocinas proinflamatorias que culmina en el desarrollo de hipersensibilidad al dolor (Liu et al., 2017). En relación con lo anterior, la amplificación del dolor resultante de la unión de HMGB1 con el TLR5 puede ser explicada por dos mecanismos posibles: 1) la

regulación de la alodinia mecánica gracias a la activación de los TLR5 expresados en fibras A β , y 2) la activación de células de la inmunidad innata que expresan TLR5, llevando a la liberación de mediadores inflamatorios que sensibilizan las terminales de neuronas sensoriales (Xu, 2015; Das, 2016).

De manera interesante, Allette y colaboradores mostraron que en neuronas sensoriales aisladas del GRD que fueron expuestas a HMGB1 se produce un aumento en el número de potenciales de acción, y que dicho efecto se bloquea con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-RAGE. De igual forma, observaron un incremento en la expresión del ARNm de RAGE en un modelo de dolor neuropático y que la hiperalgesia inducida por la ligadura del nervio tibial se revierte con la administración del anticuerpo anti-RAGE. Esto sugiere que estos receptores tienen un rol crítico en la regulación de la nocicepción en el dolor neuropático (Allette et al., 2014). Finalmente, la participación de TLR5 y RAGE en el dolor disfuncional en roedores es prácticamente desconocida. En la **Tabla 3** se resumen los estudios en donde se ha evaluado la participación de la alarmina HMGB1 y de los receptores TLR5 y RAGE en el dolor.

Tabla 3. Papel de las proteínas HMGB1, TLR5 y RAGE en el dolor.

| Proteína | Especie | Modelo/Hallazgo | Conclusión | Referencia |
|----------------|---------|---|--|-------------------------|
| HMGB1 | Rata | Inducción de alodinia táctil ante la administración de HMGB1 en el nervio ciático. | HMGB1 tiene un papel pronociceptivo. | Chacur et al., 2001. |
| HMGB1/ RAGE | Rata | La administración de HMGB1 en el nervio ciático permite el desarrollo de alodinia mecánica y térmica. La ligadura del nervio: 1) Aumenta la expresión del ARNm de HMGB1 en GRD L4 y L5. | HMGB1 tiene un papel importante en el desarrollo de hipersensibilidad en el dolor neuropático. | Shibasaki et al., 2010. |

| Proteína | Especie | Modelo/Hallazgo | Conclusión | Referencia |
|----------|---------|---|---|-----------------------|
| | | 2) Incrementa la expresión de HMGB1 en neuronas y células gliales satélite. 3) Atenúa la hipersensibilidad por la administración de anticuerpo anti-HMGB1. 4) Aumenta la expresión de RAGE en GRD. | | |
| HMGB1 | Rata | El daño al nervio tibial: 1) Incrementa los niveles de HMGB1 citoplasmático en GRD L4/L5. 2) Reduce la hipersensibilidad por la administración de glicirricina, un inhibidor de HMGB1. En neuronas sensoriales: 1) Aumenta los niveles de HMGB1 en el citoplasma y en el sobrenadante extracelular postinducción de la despolarización. 2) Se moviliza calcio en presencia de HMGB1. 3) HMGB1 incrementa la excitabilidad neuronal. | HMGB1 se libera de manera activa en neuronas sensoriales y contribuye al mantenimiento del dolor neuropático. | Feldman et al., 2012. |
| HMGB1 | Rata | La administración intraplantar de HMGB1 induce inflamación e hiperalgesia en la rata. | HMGB1 tiene un papel pronociceptivo en la inducción de hiperalgesia. | Tanaka et al., 2013. |

| Proteína | Especie | Modelo/Hallazgo | Conclusión | Referencia |
|----------------|---------|---|--|-----------------------|
| | | <p>La administración de trombomodulina recombinante humana abole la hiperalgesia producida por HMGB1.</p> <p>La hiperalgesia inducida por LPS se abole con la administración de anti-HMGB1.</p> | | |
| HMGB1/ RAGE | Rata | <p>La activación de neuronas sensoriales por at-HMGB1 es dependiente de RAGE.</p> <p>Aumenta la expresión de ARNm de RAGE en el GRD post daño del nervio tibial.</p> <p>La administración de anti-RAGE revierte la hiperalgesia mecánica producida por el daño a los nervios.</p> | <p>La activación de RAGE a través de at-HMGB1 produce la sensibilización de los nociceptores y la hiperalgesia mecánica asociada a los estados de dolor neuropático crónico.</p> | Allette et al., 2014. |
| TLR5 | Ratón | <p>El receptor TLR5 co-localiza con NF-200 en neuronas de diámetro grande, fibras A.</p> <p>La activación de TLR5 por flagelina permite la entrada a la célula de QX-314, lo que reduce las corrientes de sodio en fibras A del GRD.</p> | <p>La inducción de hipersensibilidad en modelos de dolor persistente por la activación de las fibras Aβ depende de los TLR5.</p> | Xu et al., 2015. |

| Proteína | Especie | Modelo/Hallazgo | Conclusión | Referencia |
|----------------|---------|--|--|-----------------------|
| | | <p>La administración intraplantar de flagelina y QX-314 reduce la alodinia mecánica producida por neuropatía diabética, daño a los nervios o quimioterapia.</p> <p>La co-aplicación de flagelina/QX-314 suprime la conducción de las fibras Aβ en animales naïve y con dolor por quimioterapia.</p> | | |
| HMGB1/ TLR5 | Ratón | <p>HMGB1 activa al TLR5; la región C-terminal es esencial para la unión de HMGB1 al receptor.</p> <p>La interacción HMGB1-TLR5 activa NFκB, por la vía dependiente de MyD88, liberando TNF e IL-8.</p> <p>La señalización del TLR5 mediada por HMGB1 induce alodinia táctil.</p> | <p>La unión de HMGB1 al receptor TLR5 promueve la liberación de mediadores proinflamatorios induciendo hipersensibilidad al dolor.</p> | Das et al., 2016. |
| HMGB1 | Ratón | <p>La administración intraplantar de HMGB1 en sus diferentes estados redox o de LPS produce alodinia mecánica, la cual se previene con la administración de trombomodulina soluble (TMα).</p> | <p>HMGB1 tiene un papel pronociceptivo a nivel periférico.</p> | Tsujita et al., 2018. |

| Proteína | Especie | Modelo/Hallazgo | Conclusión | Referencia |
|----------|---------|---|--|-----------------------|
| | | TM α acelera la degradación por la trombina de las formas tiol y disulfuro de HMGB1. | | |
| HMGB1 | Ratón | <p>La inyección intratecal de HMGB1 recombinante produce hiperalgesia mecánica.</p> <p>La administración i.t. de un anti-HMGB1 revierte la hipersensibilidad producida por la ligadura parcial del nervio ciático.</p> <p>Los pretratamientos con inhibidores del TLR4 e inhibidores de astrocitos previenen la hipersensibilidad evocada por HMGB1.</p> <p>Los niveles de IL-1β se ven aumentados con la activación de los astrocitos; el bloqueo de los TLR4 previene el incremento de IL-1β; anti-IL-1β previene la hipersensibilidad inducida por HMGB1.</p> | La HMGB1 aumenta los niveles de IL-1 β en los astrocitos espinales por interacción con los TLR4, produciendo hipersensibilidad al dolor. | Morioka et al., 2019. |
| HMGB1 | Ratón | La administración i.t. de ds-HMGB1 incrementa la reactividad de la microglía espinal en ambos sexos. | La forma disulfuro de HMGB1 induce conductas tipo dolorosas en machos y hembras. Sin embargo, | Agalave et al., 2020. |

| Proteína | Especie | Modelo/Hallazgo | Conclusión | Referencia |
|----------|--------------|---|---|----------------------|
| | | <p>La exposición a ds-HMGB1 en la microglía lleva al incremento del ARNm de TNF, IL-1β y CCL2 en machos.</p> <p>La ds-HMGB1 induce hipersensibilidad mecánica en machos y hembras.</p> <p>El knockout del TLR4 en la microglía o la administración de minociclina atenúa la hipersensibilidad producida por ds-HMGB1 en machos.</p> | <p>los efectos pronociceptivos a nivel central son dependientes del sexo.</p> | |
| HMGB1 | Rata y ratón | <p>En dolor neuropático por diabetes tipo 2:</p> <p>1) La administración de glicirricina revierte la hiperalgesia térmica y mecánica.</p> <p>2) El tratamiento con glicirricina disminuye la expresión de HMGB1, TLR4 y NLRP3 en GRD.</p> <p>La hiperglucemia aumenta la liberación y la localización en el citoplasma de HMGB1, revertida con el tratamiento con glicirricina.</p> | <p>Los procesos inflamatorios mediados por HMGB1, potenciados en diabetes, contribuyen al mantenimiento del dolor en la neuropatía diabética.</p> | Thakur et al., 2020. |

3. HIPÓTESIS

La activación espinal de TLR5 y RAGE contribuirá al mantenimiento de la hipersensibilidad nociceptiva inducida mediante la administración de reserpina.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación espinal de TLR5 y RAGE en la hipersensibilidad nociceptiva inducida por la reserpina en ratas.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el papel de TLR5 y RAGE, mediante herramientas farmacológicas, en la hipersensibilidad al dolor que se genera con la reserpina en ratas.
- Determinar, mediante western blot, la expresión de las proteínas TLR5 y RAGE en la médula espinal y GRD de ratas tratadas con reserpina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembras con un peso corporal de 200-220 g. Todos los animales fueron proporcionados y mantenidos en el bioterio del Cinvestav, Sede Sur, bajo condiciones de temperatura y humedad controladas y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con libre acceso a agua y alimento. Los animales se habituaron a la manipulación y a los equipos y técnicas de evaluación durante 3 días consecutivos antes de cada procedimiento. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmerman, 1983) y con los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales del Cinvestav (Protocolo 0042-13). Cada rata fue utilizada sólo una vez y se sacrificaron en una cámara con CO₂ al finalizar cada experimento.

6.2 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina

El dolor se indujo de acuerdo con el procedimiento descrito por Nagakura y colaboradores en 2009 (Nagakura et al., 2009). La reserpina a la dosis de 1 mg/kg se disolvió en una solución ácida (ácido acético al 0.5% en solución salina 0.9%). Posteriormente, se administró por vía subcutánea una vez al día durante tres días consecutivos. Para determinar si el modelo de fibromialgia inducido por reserpina generó hipersensibilidad al dolor, se evaluó si las ratas desarrollan alodinia táctil e hiperalgesia muscular.

6.3 Alodinia táctil

La alodinia fue evaluada con el método descrito por Chaplan et al. (1994). Se determinó el umbral de retiro de la pata previo a la administración de reserpina y a los días 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 posteriores a la última inyección de reserpina utilizando un método descrito en la literatura (Dixon, 1980; Chaplan, 1994). Los días de evaluación, las ratas se colocaron de forma individual en cajas de acrílico transparente sobre una malla metálica durante 30 min para habituación. Los animales fueron estimulados en la parte media de ambas patas traseras con los filamentos calibrados de von Frey. Se considera una respuesta positiva a la conducta de retiro de la pata estimulada en un lapso de hasta

8 segundos, mientras que una respuesta negativa es aquella donde el estímulo no genera el retiro de la pata en el mismo lapso. Después de la primera respuesta positiva (marcada con una “X”), la pata se estimuló otras cuatro veces tomando en total una serie de seis patrones de respuestas positivas y negativas (marcadas con un “0”). Se inició la estimulación con el filamento de 4.31 g y se ascendió o descendió con incrementos logarítmicos de rigidez (1.65-6.65 g) en función de la respuesta del animal. El 50% del umbral de retiro se calculó con la siguiente fórmula:

$$50\% \text{ umbral } (g) = \frac{10^{[Xf + k\delta]}}{10000}$$

Dónde:

Xf: valor del último filamento de von Frey utilizado (en unidades logarítmicas)

κ: factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado en base al número de respuestas positivas y negativas.

δ: diferencias de promedio, en unidades logarítmicas, entre estímulos.

6.4 Hiperalgnesia muscular

La hiperalgnesia muscular se determinó antes de la primera inyección de reserpina y en los días 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días posteriores a la última inyección. Las ratas se inmovilizaron utilizando un paño de franela y cada extremidad posterior se posicionó para aplicar una fuerza mecánica que incremente linealmente (máximo 250 g) sobre el área media del 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 por triplicado, con intervalos de un minuto entre cada estímulo. El promedio de umbral de presión muscular se calculó con base en las tres mediciones (Schäfers, 2003).

6.5 Obtención del tejido para realizar *western blot*

Las ratas se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los GRD (L4-L6) y la parte lumbar de la médula espinal (L1-S1) en su porción dorsal. Inmediatamente, se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron en tubos de centrifugación a -70°C hasta su uso. Las muestras se homogenizaron con 300 µl de amortiguador RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP40 1%, SDS 0.1%) que contiene 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). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta la cuantificación de proteínas totales.

6.6 Expresión de las proteínas TLR5 y RAGE

Se determinó la concentración de proteínas totales del sobrenadante por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron volúmenes equivalentes a 50 µg de proteína total y se sometieron a separación por electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida de dos dimensiones al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon a 4°C durante toda la noche con leche descremada al 5%. Posteriormente, se incubaron durante 24 h a 4°C con un anticuerpo primario dirigido contra TLR5 (mouse anti-TLR5; dilución 1:500, Cat. sc-57461, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o RAGE (mouse anti-RAGE, dilución 1:1000, Cat. sc-365154, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Para la inmunodetección del anticuerpo primario de ambos receptores se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (anti-mouse BP-HRP conjugado, dilución 1:7000, Cat. sc-516102, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Finalmente, mediante un sistema de quimioluminiscencia (Western Lightning® Plus-ECL, MA, EUA) se obtuvo una imagen fotográfica (ChemiDoc™ XRS+ ImagingSystem, Bio-Rad, CA, EUA) y posteriormente se realizó el análisis densitométrico de las bandas (ImageLab™ versión 5.0, Bio-Rad, CA). Después de la detección de TLR5 y RAGE, las membranas nuevamente se bloquearon e incubaron con un anticuerpo contra β-actina (mouse anti-actina, dilución 1:10000, Cat. SAB2100878, GeneTex, Irvine, CA) y su respectivo anticuerpo secundario (anti-mouse, dilución 1:7000, Cat. 115-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 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 Fármacos

El inhibidor del TLR5 TH1020 (4-((4-bencil-5-(piridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tio)pirido[3',2',4,5]-tieno [3,2-d] pirimidin,4-[[4-(fenilmetil)-5-(4-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-3-il]tio] pirido [3',2':4,5] tieno[3,2-d]pirimidina) (Cat. SML1741), el antagonista del RAGE FPS-ZM1 (N-bencil-4-cloro-N-ciclohexilbenzamida) (Cat. 553030) y la reserpina (Cat. R0875) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

6.8 Análisis de los datos y estadística

Los resultados conductuales se expresaron como la media \pm el error estándar (EE) de seis animales por grupo. El umbral de retiro y el umbral de presión muscular se graficaron 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 cada grupo. Los resultados del *western blot* se presentaron como la media \pm EE de cuatro animales por grupo graficando el porcentaje de intensidad relativa de las bandas con respecto a su control de carga.

Para determinar las diferencias entre 3 o más tratamientos, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido por la prueba de Bonferroni. Las diferencias entre dos grupos se analizaron 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 8.0.1 (GraphPad Inc. San Diego, CA).

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 Inducción del modelo de fibromialgia

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

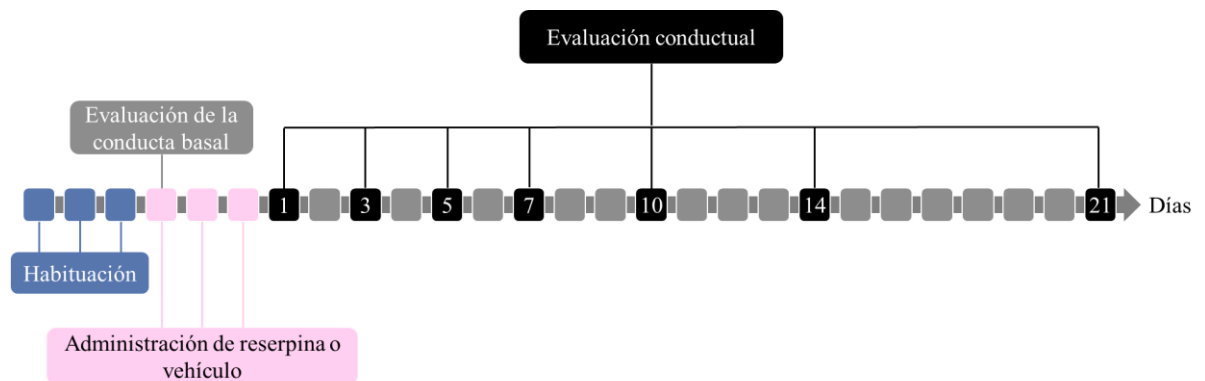


Figura 12. Diseño experimental de la evaluación conductual correspondiente al establecimiento del modelo de fibromialgia inducido por reserpina.

7.2 Evaluación farmacológica

Para evaluar la participación de TLR5 y RAGE en el mantenimiento de la hipersensibilidad al dolor en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina, se administraron el TH1020 (inhibidor de TLR5) y el FPS-ZM1 (antagonista de RAGE). Se utilizaron grupos independientes de seis ratas para cada conducta y dosis a evaluar. A los días 5 y 7 posteriores a la última administración de reserpina se realizó la inyección i.t. del vehículo o de los antagonistas a las concentraciones señaladas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Concentraciones de los fármacos.

| Fármaco | Concentración ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) | Vehículo |
|---------|--|-------------|
| TH1020 | 30, 100 y 300 | DMSO al 30% |
| FPS-ZM1 | 10, 30 y 100 | DMSO al 15% |

El efecto sobre la alodinia y la hiperalgesia se evaluó durante 8 horas (**Figura 13**).

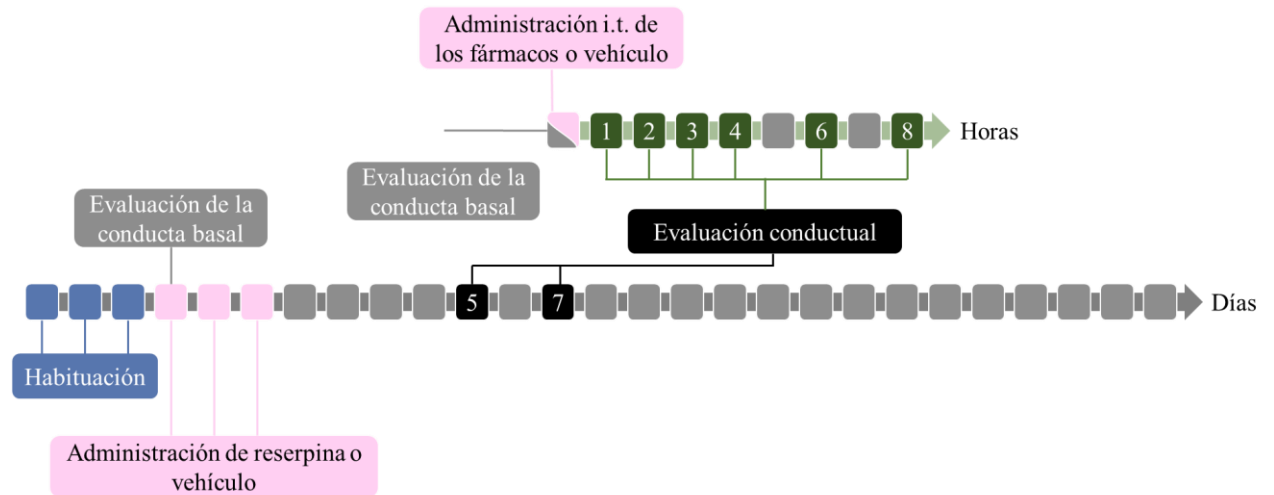


Figura 13. Diseño experimental de la evaluación del efecto en la alodinia e hiperalgesia de los fármacos en ratas reserpinizadas. i.t: intratecal.

7.3 Determinación de la expresión de TLR5 y RAGE por *western-blot*.

Se utilizaron grupos independientes de cuatro ratas para determinar los posibles cambios en la expresión de TLR5 y RAGE. Se realizó la inmunodetección de dichas proteínas mediante *western blot* a partir de muestras de GRD L4-L6 y la médula espinal dorsal, los cuales fueron extraídos a los días 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 posteriores a la última inyección de reserpina (**Figura 14**).

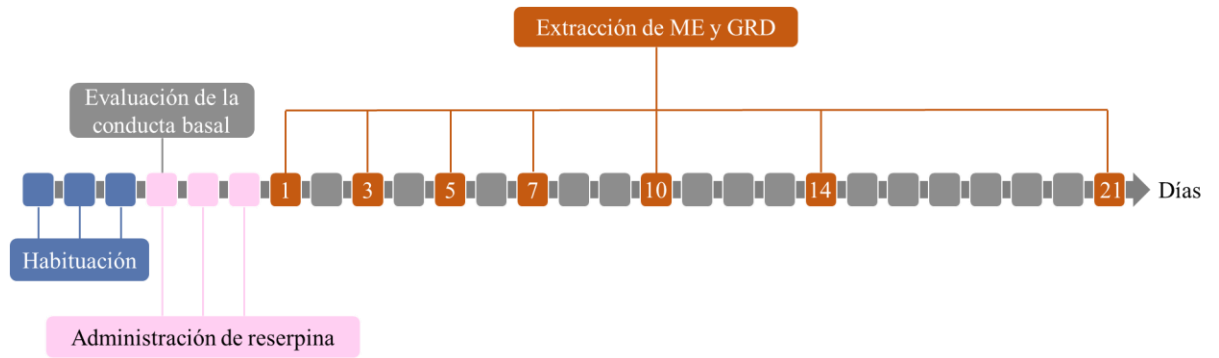


Figura 14. Diseño experimental para la extracción de médula espinal y ganglio de la raíz dorsal para el análisis por *western blot*. ME: Médula espinal; GRD: Ganglio de la raíz dorsal.

8. RESULTADOS

8.1 La reserpina indujo la aparición de conductas nociceptivas

La administración subcutánea de reserpina (1 mg/kg por 3 días) redujo el umbral de retiro en ambas patas traseras de las ratas hembra, lo que se interpretó como alodinia táctil (Figura 15A). Dicho efecto se observó a partir del primer día post-administración de reserpina y se mantuvo hasta el día siete post-administración. El efecto máximo se observó entre el día 1 y 7 posterior a la última administración de reserpina. Además, la reserpina redujo el umbral de presión muscular en ambas patas posteriores de las ratas, lo que se interpretó como hiperalgesia muscular generalizada (Figura 15B). El umbral disminuyó a partir del día tres posterior a la administración de reserpina y persistió hasta los días 10 y 14. El efecto máximo se observó al día 7 y regresó a niveles basales entre el día 14 y 21.

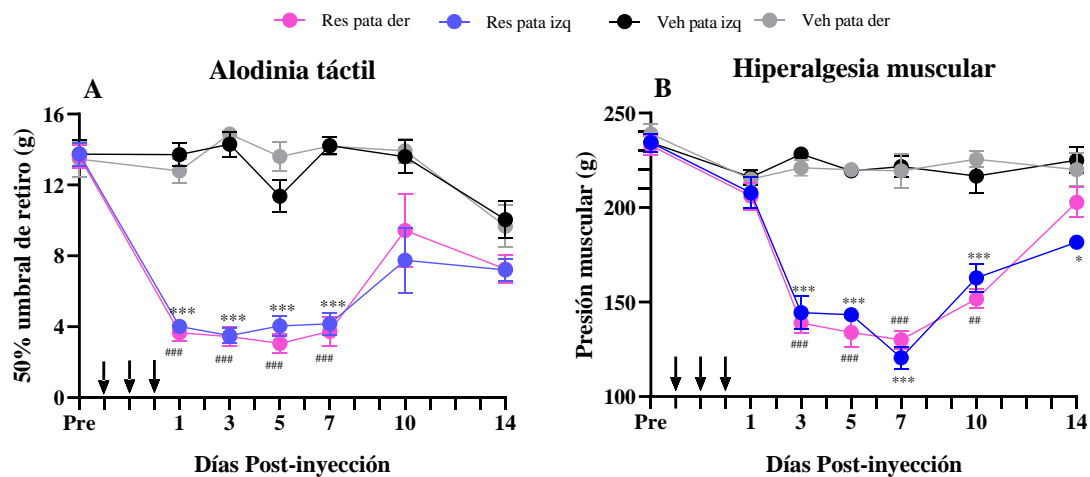


Figura 15. Curso temporal de la alodinia táctil e hiperalgesia muscular asociada con la administración de reserpina en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs Vehículo izquierda; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs Vehículo derecha, por ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Bonferroni. Las flechas indican los tiempos de administración de reserpina o vehículo. Res: Reserpina; Veh: Vehículo; der: derecha; izq: izquierda.

8.2. El antagonista de TLR5 (TH1020) revirtió parcialmente la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas

La administración intratecal de TH1020, un antagonista selectivo de TLR5, pero no su vehículo (DMSO al 30%), revirtió de manera parcial la alodinia táctil inducida por la administración subcutánea de reserpina alcanzando un efecto máximo una hora después de la administración (**Figura 16A**). El efecto del TH1020 fue dependiente de la dosis (**Figura 16B**).

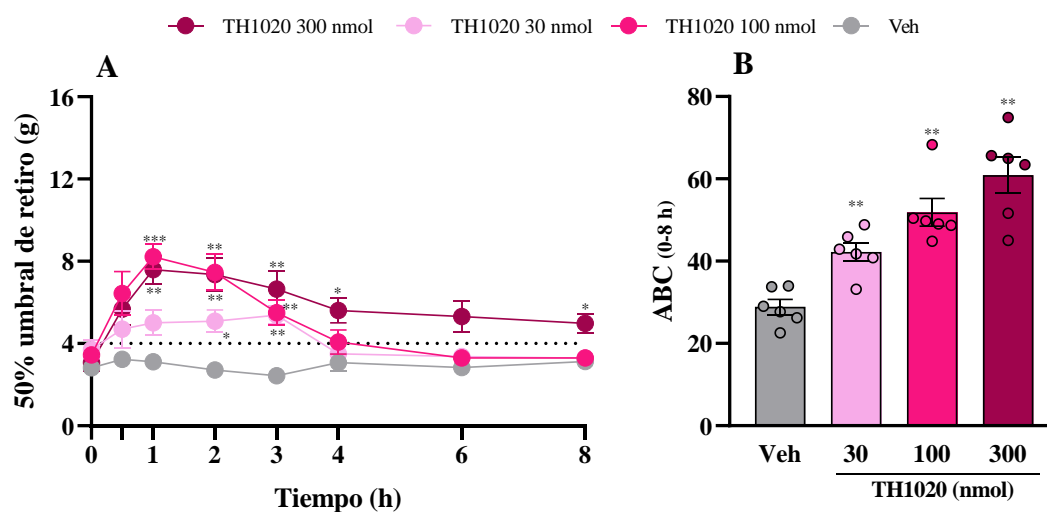


Figura 16. Efecto del TH1020 sobre la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas hembra. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de TH1020 (30 - 300 nmol) o su vehículo (DMSO 30%) sobre la alodinia táctil inducida por reserpina en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Vehículo por ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Bonferroni. **B.** Área bajo la curva calculada a partir del curso temporal. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. ** $p < 0.01$ vs Vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. Veh: Vehículo.

8.3. El antagonista de RAGE (FPS-ZM1) revirtió la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas

La administración intratecal de FPS-ZM1, un antagonista selectivo de RAGE, pero no su vehículo (DMSO al 15%), revirtió la alodinia táctil inducida por la administración de subcutánea de reserpina alcanzando un efecto máximo alrededor de 2 h después de la administración (**Figura 17A**). El efecto del FPS-ZM1 fue dependiente de la dosis (**Figura 17B**).

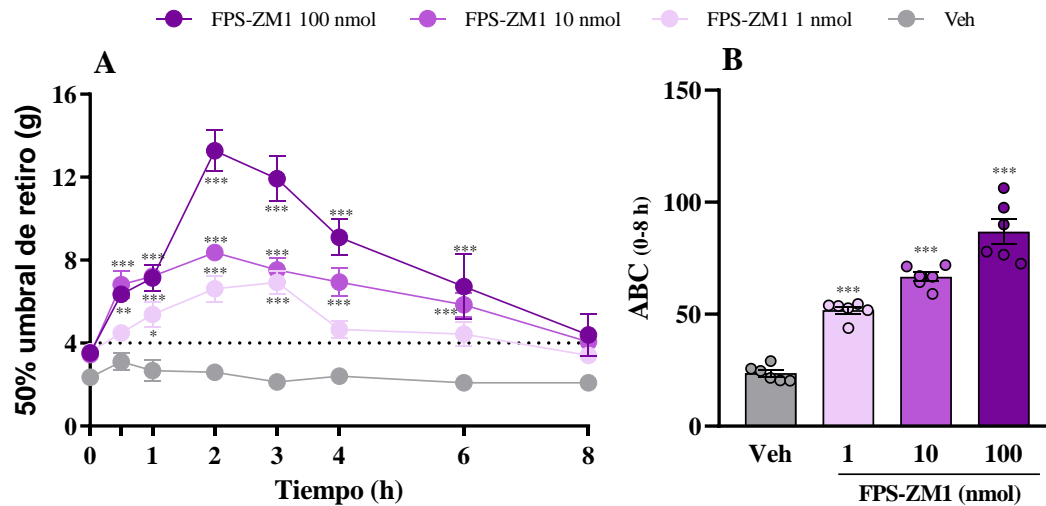


Figura 17. Efecto del FPS-ZM1 sobre la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas hembra. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de FPS-ZM1 (1 - 100 nmol) o su vehículo (DMSO 15%) sobre la alodinia táctil inducida por reserpina en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Vehículo por ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Bonferroni. **B.** Área bajo la curva calculada a partir del curso temporal. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. *** $p < 0.001$ vs Vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. Veh: Vehículo.

8.4. El antagonista de TLR5 (TH1020) no revirtió la hiperalgesia muscular inducida por la administración de reserpina en ratas

La administración intratecal de TH1020 (100 nmol) o del vehículo (DMSO 30%) no tuvieron efecto sobre la hiperalgesia muscular inducida por la administración subcutánea de reserpina (**Figura 18A y B**).

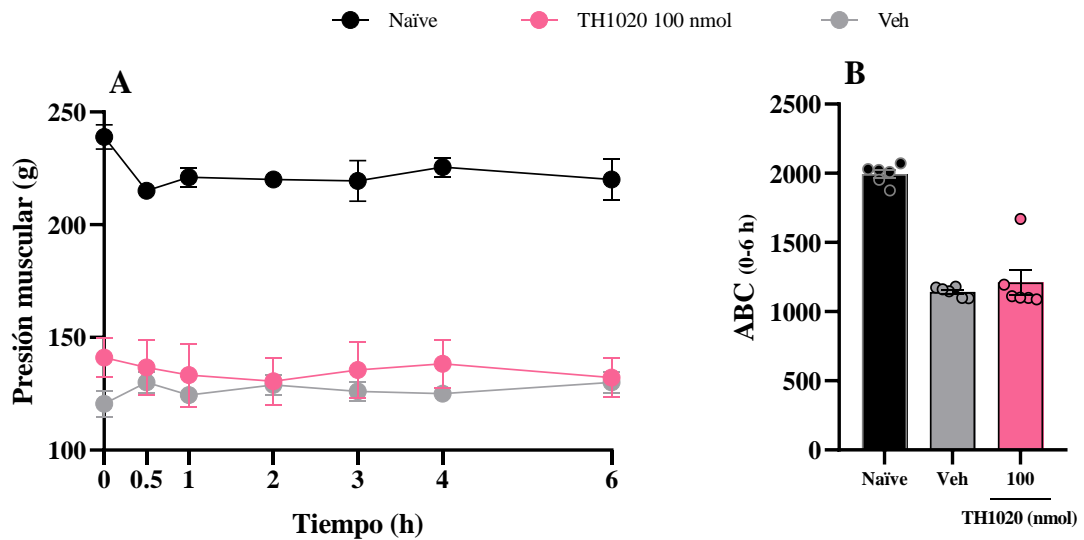


Figura 18. Efecto del TH1020 sobre la hiperalgesia muscular inducida por la administración de reserpina en ratas hembra. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de TH1020 (100 nmol) o su vehículo (DMSO 30%) sobre la hiperalgesia muscular inducida por reserpina en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. vs Vehículo por ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Bonferroni. **B.** Área bajo la curva calculada a partir del curso temporal. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. vs Vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey. Veh: Vehículo.

8.5. El antagonista de RAGE (FPS-ZM1) no modificó la hiperalgesia muscular inducida por la administración de reserpina en ratas

La administración intratecal de FPS-ZM1 (100 nmol) o su vehículo (DMSO al 15%), no revirtió la hiperalgesia muscular inducida por la administración subcutánea de reserpina (**Figura 19A y B**).

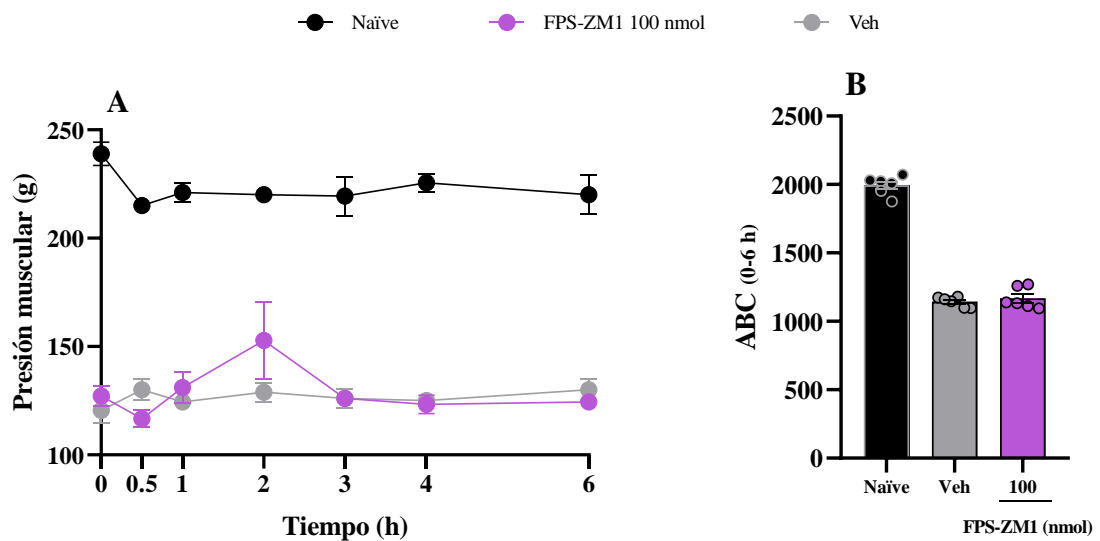


Figura 19. Efecto del FPS-ZM1 sobre la hiperalgesia muscular inducida por la administración de reserpina en ratas hembra. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de FPS-ZM1 (100 nmol) o su vehículo (DMSO 15%) sobre la hiperalgesia muscular inducida por reserpina en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. vs Vehículo por ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Bonferroni. **B.** Área bajo la curva calculada a partir del curso temporal. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. vs Vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey. Veh: Vehículo.

Estos resultados sugieren que RAGE, y en menor medida, TLR5 participan en la modulación de la alodinia táctil, pero no de la hiperalgesia muscular, en este modelo de fibromialgia.

8.6. El antagonista de TLR5 (TH1020) no modificó el umbral en ratas hembra *naïve*

Con la finalidad de evidenciar el papel de TLR5 en condiciones fisiológicas, la dosis más alta del antagonista TH1020 se administró vía intratecal en ratas *naïve*. La administración intratecal de TH1020 no modificó el umbral de retiro o presión muscular (**Figura 20 y 21**). La administración i.t. del vehículo (DMSO al 30%) no modificó la hiperalgesia o la alodinia inducida en ratas reserpinizadas.

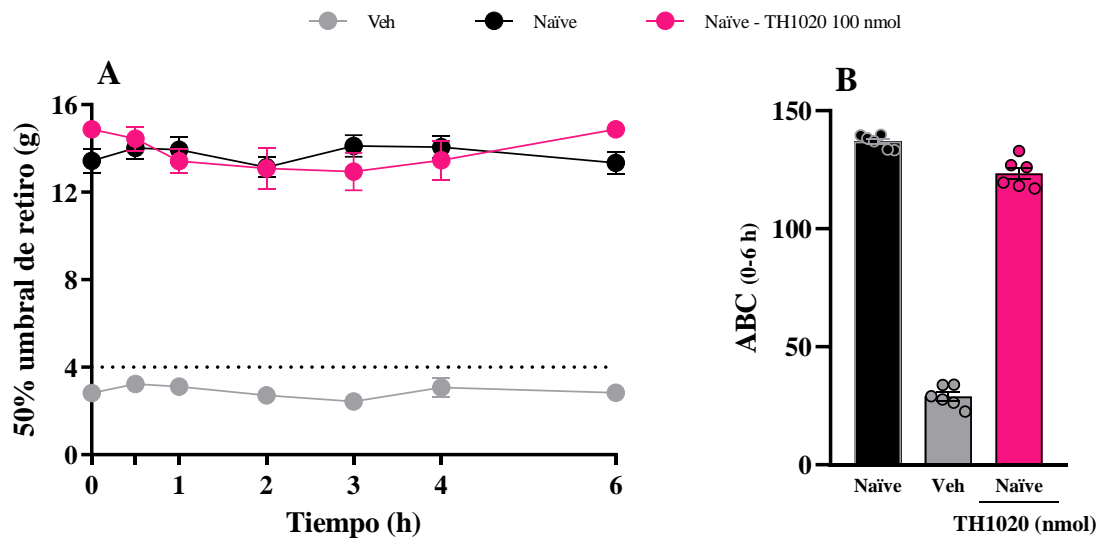


Figura 20. Efecto del TH1020 sobre la alodinia táctil en ratas hembra *naïve*. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de TH1020 (100 nmol) sobre la alodinia táctil en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. **B.** Área bajo la curva calculada a partir del curso temporal. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. Veh: Vehículo.

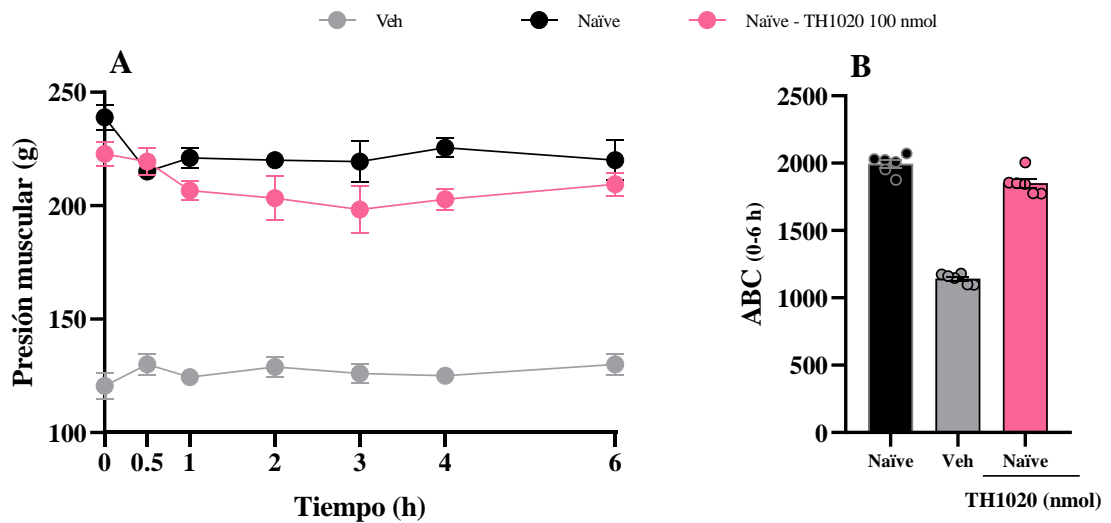


Figura 21. Efecto del TH1020 sobre la hiperalgia muscular en ratas hembra *naïve*. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de TH1020 (100 nmol) sobre la hiperalgia muscular en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. **B.** Área bajo la curva calculada a partir del curso temporal. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. Veh: Vehículo.

8.7. El antagonista de RAGE (FPS-ZM1) no modificó el umbral en ratas hembra *naïve*

Para determinar el papel de RAGE en condiciones no patológicas, la dosis más alta del antagonista FPS-ZM1 se administró vía intratecal en ratas *naïve*. La administración intratecal de FPS-ZM1 no afectó el umbral de retiro y presión muscular en ratas intactas (**Figura 22 y 23**). La diferencia significativa observada en el ABC del umbral de retiro (**Figura 22B**) se puede atribuir a que los valores basales de ese grupo de animales fueron menores en comparación con el grupo de animales intactos. La administración i.t. del vehículo (DMSO al 15%) no modificó la hiperalgesia o la alodinia inducida en ratas reserpinizadas.

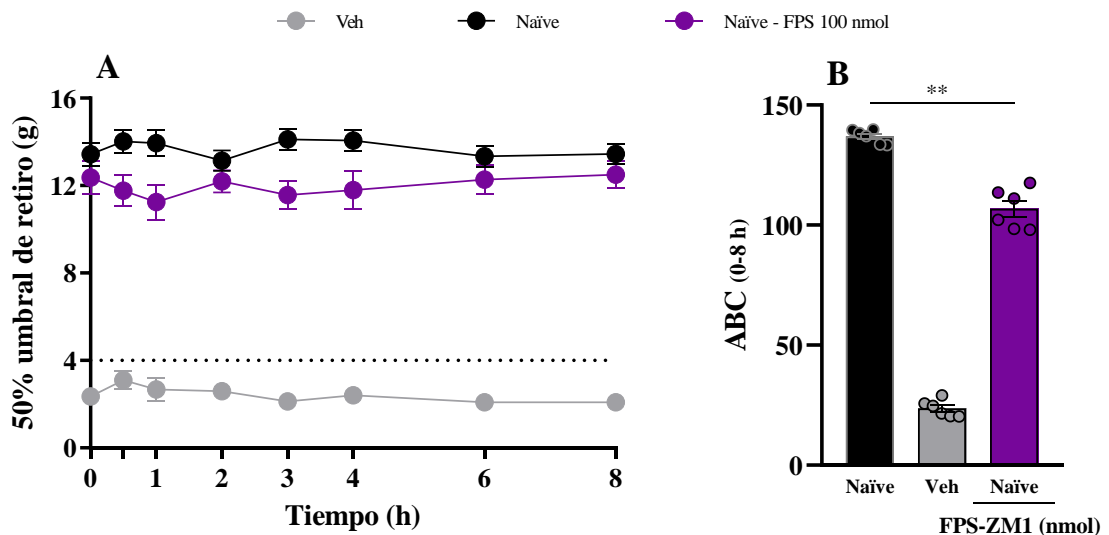


Figura 22. Efecto del FPS-ZM1 sobre la alodinia táctil en ratas hembra *naïve*. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de FPS-ZM1 (100 nmol) sobre la alodinia táctil en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. **B.** Área bajo la curva calculada a partir del curso temporal. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. ** $p < 0.01$ vs Naïve por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni. Veh: Vehículo.

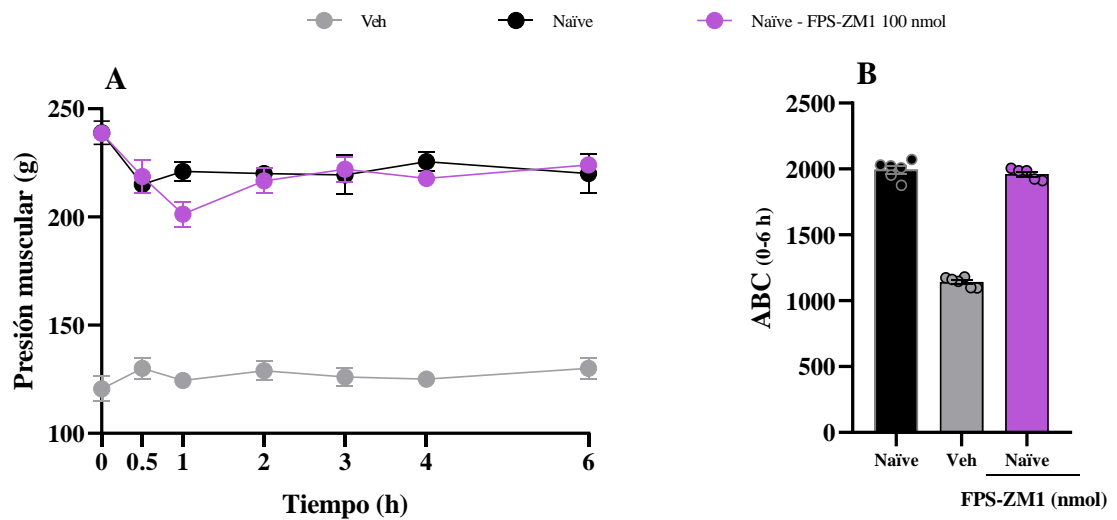


Figura 23. Efecto del FPS-ZM1 sobre la hiperalgesia muscular en ratas hembra *naïve*. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de FPS-ZM1 (100 nmol) sobre la hiperalgesia muscular en ratas hembra. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. **B.** Área bajo la curva calculada a partir del curso temporal. Representación del promedio de 6 ratas \pm EE. Veh: Vehículo.

8.8. Expresión de TLR5 y RAGE en ratas con fibromialgia

El *western blot* reveló una banda de aproximadamente 90 kDa correspondiente al peso molecular esperado para la proteína de TLR5. La reserpina aumentó la expresión de la proteína de TLR5 en los GRD L4-L6 y en la médula espinal dorsal de los animales en este modelo. Esta tendencia se observó a partir del día 7 post administración de reserpina y se mantuvo hasta el día 21 post-reserpina (**Figura 24**). El TLR5 se expresó más en la médula espinal que en los GRD.

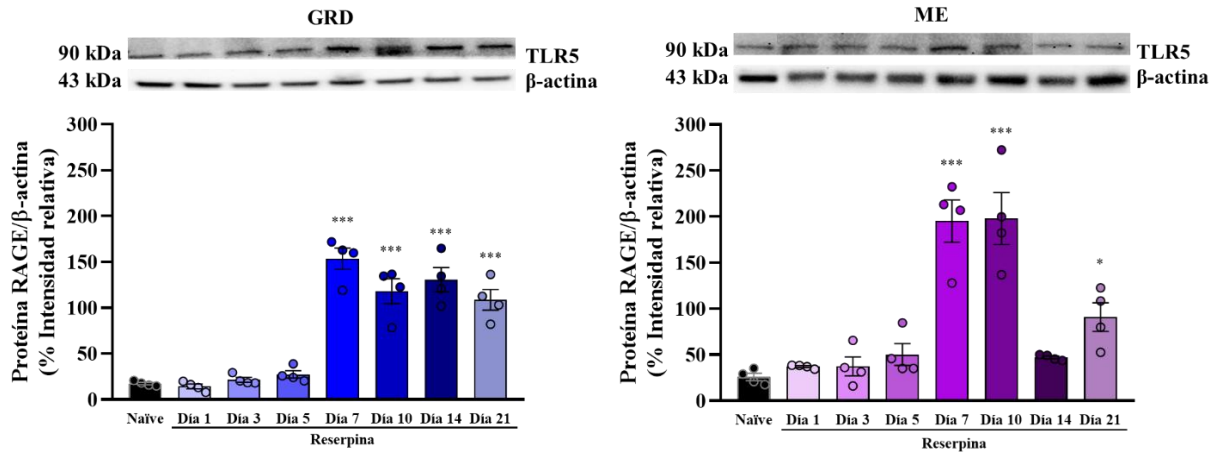


Figura 24. Expresión de la proteína de TLR5 en la médula espinal y en los ganglios de la raíz dorsal posterior a la administración de reserpina en ratas hembra. Cada barra representa el promedio de 4 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs *Naive* por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni.

En el análisis de la expresión de la proteína de RAGE, el *western blot* reveló una banda de aproximadamente 46 kDa correspondiente al peso molecular esperado para la proteína de RAGE. La reserpina aumentó el porcentaje de expresión de la proteína de RAGE en los GRD L4-L6 a los días 14 y 21 post reserpina. De manera similar, la reserpina aumentó la expresión de la proteína de RAGE en la médula espinal dorsal de los animales en este modelo a partir del día 7 hasta el día 21 post administración de reserpina (**Figura 25**). El RAGE se expresó de manera similar en los GRD y en la médula espinal.

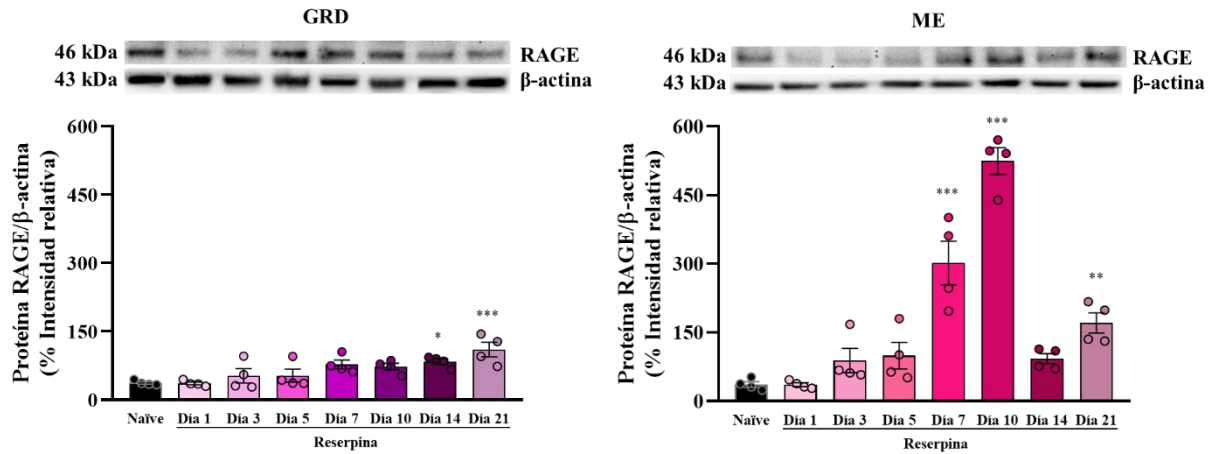


Figura 25. Expresión de la proteína de RAGE en la médula espinal y en los ganglios de la raíz dorsal posterior a la administración de reserpina en ratas hembra. Cada barra representa el promedio de 4 ratas \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs *Naïve* por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni.

9. DISCUSIÓN

9.1. Alteraciones en la nocicepción inducidas por la administración de reserpina

En el presente estudio se observó que la administración de reserpina (1 mg/kg, 3 días consecutivos) produjo alodinia táctil e hiperalgesia muscular en ratas hembra. Estos datos concuerdan con estudios que demuestran el papel de la reserpina como inductor de hiperalgesia muscular, hipersensibilidad térmica y alodinia mecánica y al frío en ratas (Kulkarni, 1980; Kulkarni y Robert, 1982; Nagakura et al., 2009; Arora et al., 2011; Kaneko et al., 2014; Blasco-Serra et al., 2015; Murai et al., 2015; Taguchi et al., 2015; Zhang et al., 2016). Nuestros resultados muestran que la reserpina produce hipersensibilidad mecánica y muscular en ambas patas traseras de ratas hembra, lo que sugiere que la administración de reserpina es capaz de generar un modelo de dolor generalizado. Esto concuerda con lo reportado por Nagakura y colaboradores (Nagakura et al., 2009). Asimismo, los datos obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por otros grupos de investigación en distintos modelos de fibromialgia como la inyección de salina ácida (Sluka et al., 2001; Sluka et al., 2003; Chen et al., 2014; Tian et al., 2018; Chang et al., 2019; Ueda et al., 2020) y la exposición a diferentes tipos de estresores (Khasar et al., 2009; Cheng et al., 2011; Quintero et al., 2000; Hung et al., 2020) en roedores. Nuestros resultados sugieren que la administración de reserpina produce hipersensibilidad nociceptiva generalizada, lo que simula al dolor que se presenta en las personas con fibromialgia.

Se cree que uno de los mecanismos por el cual se genera la hipersensibilidad en este modelo es la unión irreversible de la reserpina al transportador vesicular de monoaminas (VMAT), lo que impide el almacenamiento de NA, DA y 5-HT en sus vesículas (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 ocasiona un desbalance entre los sistemas de inhibición y facilitación de la modulación descendente del dolor, favoreciendo este último y llevando a un aumento generalizado en la sensibilidad nociceptiva (Ossipov et al., 2014). Se sabe que la reserpina induce la activación de la microglía localizada en el asta dorsal de la médula espinal y que dicha activación contribuye al desarrollo de la hiperalgesia mecánica en este modelo (Taguchi et al.,

2015). Asimismo, se ha visto que hay un aumento de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β y TNF, en el cerebro de roedores tras la administración de reserpina (Szelenyi et al., 2000; Huang et al., 2014; Arora y Chopra, 2013). Esto sugiere que la respuesta inmune forma parte de un posible mecanismo que contribuye a la aparición de conductas nociceptivas en este modelo de fibromialgia. Lo anterior concuerda con lo visto en la clínica, en donde se han encontrado niveles elevados de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, TNF y HMGB1 en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con fibromialgia (Wallace et al., 2001; Gur et al., 2002; Oktayoglu et al., 2013). De igual forma, se ha demostrado que ocurre un incremento en la activación de la microglía en la corteza cerebral de pacientes con fibromialgia (Albrecht et al., 2019). De manera interesante, los grupos de investigación de la Dra. Svensson y el Dr. Andersson en un artículo reciente (Goebel et al., 2021) demostraron que la administración de la inmunoglobulina G (IgG) de pacientes con fibromialgia en ratones induce la aparición de conductas nociceptivas gracias a la sensibilización de las aferentes primarias en dichos animales. Esto puede sugerir que la fibromialgia tiene un componente autoinmune, lo que requiere de mayor investigación.

9.2. TLR5 y RAGE participaron en el mantenimiento de la hipersensibilidad nociceptiva inducida por reserpina

En el presente trabajo se observó que el TH1020, un inhibidor del complejo flagelina/TLR5, revirtió de manera parcial la alodinia táctil. Por el contrario, el TH1020 no tuvo efecto sobre la hiperalgesia muscular inducida en este modelo de fibromialgia. Asimismo, el FPS-ZM1, un fármaco que bloquea el sitio de unión al ligando del RAGE, revirtió la alodinia táctil inducida por la administración de reserpina en ratas hembra, pero no la hiperalgesia muscular, inducida por la administración de reserpina.

Estos resultados nos permiten sugerir que TLR5 y RAGE a nivel espinal participan en la modulación de la alodinia táctil inducida por reserpina. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios previos que demostraron el efecto pronociceptivo que tienen los TLR5 y RAGE. Por ejemplo, se ha reportado que la activación del TLR5 por flagelina y HMGB1 induce alodinia mecánica en ratones (Das et al., 2016). Esto concuerda con lo descrito previamente por Stokes y colaboradores (2013) en donde

observaron que el *knockout* de TLR5 atenúa la alodinia táctil en ratones con dolor neuropático. Por otro lado, se ha visto que el TLR5 se localiza principalmente en las fibras A β en el GRD, y que la coadministración de flagelina y de un derivado de lidocaína (QX-314) revierte la alodinia mecánica producida por quimioterapia (Xu et al., 2015). Estudios previos han demostrado que la activación de los TLR5 en la microglía induce la liberación de mediadores proinflamatorios, regulación de la quimiotaxis e incremento en la actividad fagocítica (Ifuku et al., 2020). Adicionalmente, se ha descrito la participación del TLR5 en la formación de un heterodímero con el TLR4 en respuesta al daño a los pulmones, esta interacción regula la señalización canónica del TLR4 y promueve y potencia la activación de la vía dependiente de MyD88 (Mizel et al., 2003; Hussain et al., 2020). Esto genera un incremento en la liberación de citocinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF. Lo anterior nos permite sugerir que la activación del TLR5, tanto en las fibras A β como en las células gliales, y su posible interacción con otros receptores como TLR4 podrían contribuir al desarrollo de conductas nociceptivas.

De manera análoga, Allette y colaboradores (2014) identificaron que tras la administración de un anticuerpo anti-RAGE se revierte la hiperalgesia mecánica producida en roedores con dolor neuropático. También se ha visto que la activación de RAGE por HMGB1 sensibiliza a las neuronas del GRD y el bloqueo de esta activación podría contribuir al desarrollo de analgesia en ratas diabéticas (Bestall et al., 2018). Asimismo, se observó que la administración de piridoxamina (un inhibidor de los productos de glicosilación avanzada) revierte la alodinia mecánica inducida en ratas diabéticas. Este efecto ocurre gracias al bloqueo de la activación del RAGE espinal y de la vía de señalización dependiente de NF- κ B por la piridoxamina (Zhang et al., 2020). A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que evalúa el papel de TLR5 y RAGE en un modelo de dolor funcional en la rata.

9.3. TLR5 y RAGE no participaron en el mantenimiento de la hiperalgesia muscular en el modelo de fibromialgia

Este trabajo demuestra que el bloqueo farmacológico de la actividad de TLR5 y RAGE no tiene efecto sobre el umbral de presión muscular observado en ratas hembra en este

modelo de fibromialgia. Existe evidencia que sugiere que el dolor producido a nivel muscular difiere con otros tipos de dolor, como el cutáneo, en los mecanismos que lo originan. Para la generación del dolor muscular el ATP y los protones (H^+) son particularmente importantes. Estas moléculas son liberadas por las células musculares como metabolitos tras la fatiga o daño, lo que permite la activación de sus receptores (P2X3 o ASIC3) en los nociceptores que inervan al musculo. Dicha activación sensibiliza a las aferentes primarias produciendo hipersensibilidad en las fibras musculares. Asimismo, estos metabolitos pueden activar a los macrófagos adyacentes produciendo la liberación de mediadores inflamatorios hacia los nociceptores, lo que contribuye al desarrollo de hipersensibilidad (Jankowski et al., 2013; Gregory et al., 2015; Lesna y Sluka, 2019). También se ha sugerido que el estrés oxidativo podría estar participando en las alteraciones que se producen en las fibras musculares en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. Favero y colaboradores demostraron que la reserpina induce cambios a nivel mitocondrial en las fibras musculares y que estos cambios incrementan la liberación de especies reactivas de oxígeno lo que sensibiliza a las fibras aferentes que inervan al musculo (Favero et al., 2017; Favero et al., 2019). En conjunto, estos datos nos permiten sugerir que la hiperalgesia muscular producida en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina depende, en gran medida, de los mecanismos periféricos de nocicepción. Por este motivo, el bloqueo espinal de TLR5 y RAGE no produjo efecto en el umbral de presión muscular producido por la reserpina.

9.4. La reserpina aumentó la expresión de las proteínas de TLR5 y RAGE

TLR5 y RAGE se encontraron en la parte dorsal de la médula espinal y en los GRD de ratas naïve y tratadas con reserpina. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran la expresión constitutiva de TLR5 (Xu et al., 2015; Jung et al., 2018; Donnelly et al., 2020) y RAGE (Allette et al., 2014; Li et al., 2016) en estos sitios.

La reserpina aumentó la expresión de TLR5 y RAGE en GRD y en la médula espinal. Estos cambios correlacionan con el aumento de las conductas nociceptivas en las ratas reserpinizadas. En apoyo a nuestros datos, existe evidencia en donde se describe un aumento en la expresión de TLR5 y RAGE en modelos de dolor neuropático (Allette

et al., 2014; Xu et al., 2015; Li et al., 2016; Wang et al., 2017; Wei et al., 2017; Zhang et al., 2017, 2020) e inflamatorio (Nair et al., 2021). Esto nos sugiere que TLR5 y RAGE participan en el mantenimiento del dolor maladaptativo. La actividad de estos receptores podría estar modificada en estadios de dolor gracias a que se modulan por fosforilación (Iverson et al., 2007; Evankovich et al., 2017). De manera interesante, se ha observado que la interacción entre la proteína MyD88 del TLR2/4 y RAGE fosforilado aumenta la respuesta inflamatoria mediada por estos receptores (Sakaguchi et al., 2011). Esto nos lleva a sugerir que el TLR5 podría interactuar de manera similar con RAGE en el dolor.

A nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que evalúa la expresión de TLR5 y RAGE en un modelo de fibromialgia en ratas. En conjunto, nuestros datos sugieren que TLR5 y RAGE tienen un papel pronociceptivo en condiciones de dolor funcional en la rata.

10. CONCLUSIONES

- Los TLR5 espinales tienen un papel pronociceptivo en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina en ratas hembra.
- Los RAGE espinales tienen un papel pronociceptivo en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina en ratas hembra.
- La reserpina aumenta la expresión de la proteína de TLR5 y RAGE en el GRD y en la médula espinal.

11. PERSPECTIVAS

En esta investigación presentamos información novedosa sobre la participación de TLR5 y RAGE (espinales) en la hipersensibilidad al dolor inducida por reserpina. Esto nos permite proponer una serie de experimentos subsecuentes para contribuir a la dilucidación de los mecanismos del dolor crónico en este modelo de dolor disfuncional. Entre estos experimentos destacan los siguientes:

- Evaluar el efecto del *knockdown* de TLR5 y RAGE sobre las conductas nociceptivas inducidas por la reserpina.
- Determinar mediante RT-qPCR la expresión de TLR5 y RAGE después del tratamiento con el siRNA dirigido a éstos.
- Evaluar mediante herramientas farmacológicas el papel de la alarmina HMGB1 en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. Así como la posible interacción de la alarmina con TLR5 y RAGE.
- Caracterizar mediante herramientas de inmunohistoquímica la localización celular y subcelular de HMGB1, TLR5 y RAGE en los GRD y la médula espinal.
- Determinar la posible formación de heterodímeros del TLR5 y RAGE con otros receptores involucrados en la nocicepción como TLR4 o TRPV1.

12. REFERENCIAS

- Ablin J., Fitzcharles M. A., Buskila D., Shir Y., Sommer C., Häuser W. (2013). Treatment of fibromyalgia syndrome: recommendations of recent evidence-based interdisciplinary guidelines with special emphasis on complementary and alternative therapies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(485272).
- Agalave N. M., Larsson M., Abdelmoaty S., Su J., Baharpoor A., Lundbäck P., Palmblad K., Andersson U., Harris H., Svensson C. I. (2014). Spinal HMGB1 induces TLR4-mediated long-lasting hypersensitivity and glial activation and regulates pain-like behavior in experimental arthritis. *Pain*, 155(9): 1802-1813.
- Agalave N. M., Rudjito R., Farinotti A. B., Khoonsari P. E., Sandor K., Nomura Y., Szabo-Pardi T. A., Urbina C. M., Palada V., Price T. J., Erlandsson-Harris H., Burton M. D., Kultima K., Svensson C. I. (2020). Sex-dependent role of microglia in disulfide high mobility group box 1 protein-mediated mechanical hypersensitivity. *Pain*, 162(2): 446-458.
- Agalave N. M., Svensson C. I. (2014). Extracellular high-mobility group box 1 protein (HMGB1) as a mediator of persistent pain. *Molecular Medicine*, 20: 569-578.
- Akira S., Takeda K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4: 499-511.
- Albrecht D.S., Forsberg A., Sandstrom A., Bergan C., Kadetoff D., Protsenko E., Lampa J., Lee Y.C., Höglund C.O., Catana C., Cervenka S., Akeju O., Lekander M., Cohen G., Halldin C., Taylor N., Kim M., Hooker J.M., Edwards R.R., Napadow V., Kosek E., Loggia M.L. (2019). Brain glial activation in fibromyalgia - a multi-site positron emission tomography investigation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 75: 72-83.
- Allette Y. M., Due M. R., Wilson S. M., Feldman P., Ripsch M. S., Khanna R., White F. A. (2014). Identification of a functional interaction of HMGB1 with receptor for advanced glycation end-products in a model of neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42: 169-177.

- Aravalli R. N., Peterson P. K., Lokensgard J. R. (2007). Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2: 297-312.
- Arnold L. M., Hirsch I., Sanders P., Ellis A., Hughes B. (2012). Safety and efficacy of esreboxetine in patients with fibromyalgia: a fourteen-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. *Arthritis and Rheumatism*, 64(7): 2387-2397.
- 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 behaviour in a rodent model. *Journal of Affective Disorders*, 151(3): 1041-1052.
- Arora V., Kuhad A., Tiwari V., Chopra K. (2011). Curcumin ameliorates reserpine-induced pain—depression dyad: Behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidence. *Psychoneuroendocrinology*, 36: 1570-1581.
- Baraniuk J. N., Whalen G., Cunningham J., Clauw D. J. (2004). Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. *Biomed Central 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(1): 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.
- Basbaum A. I., Woolf C. J. (1999). Pain. *Current Biology*, 12(9): 429-431.
- Basch M. C., Chow E. T., Logan D. E., Schechter N. L., Simons L. E. (2015). Perspectives on the clinical significance of functional pain syndromes in children. *Journal of Pain Research*, 8: 675-686.

- Bazzichi L., Giacomelli C., Consensi A., Giorgi V., Batticciotto A., Di Franco M., Sarzi-Puttini P. (2020). One year in review 2020: fibromyalgia. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 38(Suppl 123): 3-8.
- Bestall S. M., Hulse R. P., Blackley Z., Swift M., Ved N., Paton K., Beazley-Long N., Bates D. O., Donaldson L. F. (2018). Sensory neuronal sensitisation occurs through HMGB-1-RAGE and TRPV1 in high-glucose conditions. *Journal of Cell Science*, 131(14): jcs215939.
- Bjurstrom M. F., Giron S. E., Griffis C. A. (2016). Cerebrospinal fluid cytokines and neurotrophic factors in human chronic pain populations: a comprehensive review. *Pain Practice*, 16: 183-203.
- Blasco-Serra A., Escrihuela-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.
- Bonaterra G. A., Then H., Oezel L., Schwarzbach H., Ocker M., 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.
- Bouhassira D., Lantéri-Minet M., Attal N., Laurent B., Touboul C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, 136(3): 380-387.
- Bourne S., Machado A. G., Nagel S. J. (2014). Basic anatomy of physiology of pain pathways. *Neurosurgery Clinics of North America*, 25: 629-638.
- 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.
- Braz J., Solorzano C., Wang X., Basbaum A. I. (2014). Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron*, 82(3): 522-536.
- Brederson J. D., Strakhova M., Mills C., Barlow E., Meyer A., Nimmrich V., Leddy M., Simler G., Schmidt M., Jarvis M., Lacy S. (2016). A monoclonal

antibody against the receptor for advanced glycation end products attenuates inflammatory and neuropathic pain in the mouse. *European Journal of Pain*, 20(4): 607-614.

- Buchman D. Z., Wadhawan S. (2019). A global vision for neuroethics needs more social justice: brain imaging, chronic pain, and population health inequalities. *AJOB Neuroscience*, 10(3): 130-132.
- Calandre E. P., Rico-Villademoros F., Slim M. (2015). An update on pharmacotherapy for the treatment of fibromyalgia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16(9): 1347-1368.
- Carville S. F., Arendt-Nielsen S., Bliddal H. (2008). EULAR evidence-based recommendations for the management of fibromyalgia syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(4): 536-541.
- Chacur M., Milligan E. D., Gazda L. S., Armstrong C., Wang H., Tracey K. J., Maier S. F., Watkins L. R. (2001). A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain*, 94(3): 231-244.
- Chang J. H., Tsai S. Y., Zeng Y. J., Liu Y. C., Li C. Y., Chen K. B., Wen Y. R. (2019). Ovarian hormone-dependent and spinal ERK activation-regulated nociceptive hypersensitivity in female rats with acid injection-induced chronic widespread muscle pain. *Scientific Reports*, 9(1): 3077.
- Chaplan S. R., Bach F. W., Chung J. M., Yaksh T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53: 55-63.
- Chen W. N., Lee C. H., Lin S. H., Wong C. W., Sun W. H., Wood J. N., Chen C. C. (2014). 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.
- Clauw D. J. (2014). Fibromyalgia: a clinical review. *Journal of the American Medical Association*, 311: 1547-1555.
- Cohen S. P., Mao J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *British Medical Journal*, 348(6): f7656-f7656.

- Cohen S. P., Verdolin M. H., Chang A. S., Kurihara C., Morlando B. J., Mao J. (2006). The intravenous ketamine test predicts subsequent response to an oral dextromethorphan treatment regimen in fibromyalgia patients. *The Journal of Pain*, 7(6): 391-398.
- Coskun-Benlidayi I. (2019). Role of inflammation in the pathogenesis and treatment of fibromyalgia. *Rheumatology International*, 39: 781-791.
- Costigan M., Woolf C. J. (2000). Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain*, 1(Suppl 3): 35-44.
- 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., Ganty P. (2016). Common functional pain syndromes. *British Journal of Anaesthesia Education*, 16(10): 334-340.
- Crofford L. J., Rowbotham M. C., Mease P. J. (2005). Pregabalin for the treatment of fibromyalgia syndrome: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and Rheumatism*, 52(4): 1264-1273.
- Das N., Dewan V., Grace P. M., Gunn R. J., Tamura R., Tzarum N., Watkins L. R., Wilson I. A., Yin H. (2016). HMGB1 activates proinflammatory signaling via TLR5 leading to allodynia. *Cell Reports*, 17(4): 1128-1140.
- De la Luz-Cuellar Y. E., Rodríguez-Palma E. J., Franco-Enzastiga U., Salinas-Abarca A. B., Delgado-Lezama R., Granados-Soto V. (2019). Blockade of spinal α_5 -GABA_A receptors differentially reduces reserpine-induced fibromyalgia-type pain in female rats. *European Journal of Pharmacology*, 858: 172443.
- Dedhia J. D., Bone M. E. (2009). Pain and fibromyalgia. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care and Pain*, 9(5): 162-166.
- DeSantana J. M., da Cruz K., Sluka K. A. (2013). Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Research and Therapy*, 15: 222.

- Dixon W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20: 441-462.
- Djouhri L., Lawson S. N. (2004). A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research*, 46(2): 131-145.
- Donnelly C. R., Chen O., Ji R. R. (2020). How do sensory neurons sense danger signals? *Trends in Neuroscience*, 43(10): 822-838.
- Dubin A. E., Patapoutian A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11): 3760-3772.
- Evankovich J., Lear T., Mckelvey A., Dunn S., Londino J., Liu Y., Chen B. B., Mallampalli R. K. (2017). Receptor for advanced glycation end products is targeted by FBXO10 for ubiquitination and degradation. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(9): 3894-3903.
- Favero G., Bonomini F., Franco C., Rezzani R. (2019). Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of a fibromyalgia model: The potential benefits of melatonin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3): 765.
- 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., 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.
- Fitzcharles M. A., Ste-Marie P. A., Goldenberg D. L. (2013). Canadian guidelines for the diagnosis and management of fibromyalgia syndrome: executive summary. *Pain Research and Management*, 18(3): 119-126.
- Fornasari D. (2012). Pain mechanisms in patients with chronic pain. *Clinical Drug Investigation*, 32(Suppl 1): 45-52.
- Gardella S., Andrei C., Ferrera D., Lotti L. V., Torrisi M. R., Bianchi M. E., Rubartelli A. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via

a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports*, 3(10): 995-1001.

- Giovenco S. L., Russell I. J., Larson A. A. (1999). Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *Journal of Rheumatology*, 26(7): 1564-1569.
- Goebel A., Krock E., Gentry C., Israel M. R., Jurczak A., Urbina C. M., Sandor K., Vastani N., Maurer M., Cuhadar U., Sensi S., Nomura Y., Menezes J., Baharpoor A., Brieskorn L., Sandström A., Tour J., Kadetoff D., Haglund L., Kosek E., Bevan S., Svensson C. I., Andersson D. A. (2021). Passive transfer of fibromyalgia symptoms from patients to mice. *Journal of Clinical Investigation*, 131(13): e144201.
- Goldberg D. S., McGee S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BioMed Central Public Health*, 11: 770.
- Goodwin G.H., Johns E. H. (1973). Isolation and characterization of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *European Journal of Biochemistry*, 40(1): 215-219.
- 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: 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: 2668-2676.
- Gregory N. S., Whitley P. E., Sluka K. A. (2015). Effect of intramuscular protons, lactate, and ATP on muscle hyperalgesia in rats. *PLoS One*, 10: e0138576.
- Gür A., Karakoç M., Nas K., Remzi, Cevik, Denli A., Saraç J. (2002). Cytokines and depression in cases with fibromyalgia. *Journal of Rheumatology*, 29(2): 358-61.
- 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: 10000-10006.

- Harris R. E., Sundgren P. C., Craig A. D. (2009). Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain. *Arthritis and Rheumatism*, 60(10): 3146-3152.
- Häuser W., Ablin J., Fitzcharles M. A., Littlejohn G., Luciano J. V., Usui C., Walitt B. (2015). Fibromyalgia. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(15022): 1-16.
- Häuser W., Arnold B., Eich W. (2008). Management of fibromyalgia syndrome-an interdisciplinary evidence-based guideline. *German Medical Science*, 6.
- Häuser W., Bernardy K., Üçeyler N., Sommer C. (2009). Treatment of fibromyalgia syndrome with gabapentin and pregabalin-a meta-analysis of randomized controlled trials. *Pain*, 145(1): 69-81.
- Häuser W., Perrot S., Clauw D. J., Fitzcharles M. (2018). Unravelling fibromyalgia – Steps towards individualized management. *The Journal of Pain*, 19(2): 125-134.
- Häuser W., Urrútia G., Tort S., Üçeyler N., Walitt B. (2018). Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) for fibromyalgia syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2: CD010292.
- Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832): 1099-103.
- Hearn L., Derry S., Moore R. A. (2012). Lacosamide for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2: CD009318.
- Hilliard P. E. (2010). Functional pain syndromes: Presentation and pathophysiology. *Anesthesiology*, 112(5): 1298.
- Hisaoka-Nakashima K., Tomimura Y., Yoshii T., Ohata K., Takada N., Zhang F. F., Nakamura Y., Liu K., Wake H., Nishibori M., Nakata Y., Morioka N. (2019). High-mobility group box 1-mediated microglial activation induces

anxiodepressive-like behaviors in mice with neuropathic pain. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92: 347-362.

- Hori O., Brett J., Slattery T., Cao R., Zhang J., Chen J. X., Nagashima M., Lundh E. R., Vijay S., Nitecki D. (1995). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43): 25752-61.
- Hsu W. H., Lee C. H., Chao Y. M., Kuo C. H., Ku W. C., Chen C. C., Lin Y. L. (2019). ASIC3-dependent metabolomics profiling of serum and urine in a mouse model of fibromyalgia. *Scientific Reports*, 9(1): 12123.
- Huang Q. J., Jiang H., Hao X. L., Minor T. R. (2004). Brain IL-1 beta was involved in reserpine-induced behavioral depression in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25: 293-296.
- Hudson L. J., Bevan S., Wotherspoon G., Gentry C., Fox A., Winter J. (2001). VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *European Journal of Neuroscience*, 13: 2105-2114.
- Hung C. H., Lee C. H., Tsai M. H., Chen C. H., Lin H. F., Hsu C. Y., Lai C. L., Chen C. C. (2020). Activation of acid-sensing ion channel 3 by lysophosphatidylcholine 16:0 mediates psychological stress-induced fibromyalgia-like pain. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(12): 1644-1656.
- Hussain S., Johnson C. G., Sciruba J., Meng X., Stober V. P., Liu C., Cyphert-Daly J. M., Bulek K., Qian W., Solis A., Sakamachi Y., Trempus C. S., Aloor J. J., Gowdy K. M., Foster W. M., Hollingsworth J. W., Tighe R. M., Li X., Fessler M. B., Garantziotis S. (2020). TLR5 participates in the TLR4 receptor complex and promotes MyD88-dependent signaling in environmental lung injury. *Elife*, 9: e50458.
- Huttunen H. J., Fages C., Rauvala H. (1999). Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappa B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 19919-19924.

- Huttunen H. J., Rauvala H. (2004). Amphoterin as an extracellular regulator of cell motility: from discovery to disease. *Journal of Internal Medicine*, 255: 351-366.
- Hylands-White N., Duarte R. V., Raphael J. H. (2017). An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatology International*, 37: 29-42.
- Ifuku M., Hinkelmann L., Kuhrt L. D., Efe I. E., Kumbol V., Buonfiglioli A., Krüger C., Jordan P., Fulde M., Noda M., Kettenmann H., Lehnardt, S. (2020). Activation of Toll-like receptor 5 in microglia modulates their function and triggers neuronal injury. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1).
- Imbe H., Kimura A. (2015). Repeated forced swim stress prior to complete Freund's adjuvant injection enhances mechanical hyperalgesia and attenuates the expression of pCREB and Δ FosB and the acetylation of histone H3 in the insular cortex of rat. *Neuroscience*, 301: 12-25.
- 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.
- International Association for the Study of Pain. (1986). Classification of chronic pain: introduction. *Pain*, 24: S3-S8.
- Iqbal R., Mughal M. S., Arshad N., Arshad M. (2011). Pathophysiology and antioxidant status of patients with fibromyalgia. *Rheumatology International*, 31(2): 149-152.
- Ivison S. M., Graham N. R., Bernales C. Q., Kifayet A., Ng N., Shobab L. A., Steiner T. S. (2007). Protein kinase D interaction with TLR5 is required for inflammatory signaling in response to bacterial flagellin. *Journal of Immunology*, 178(9): 5735-43.
- Jankowski M. P., Rau K. K., Ekmann K. M., Anderson C. E., Koerber H. R. (2013). Comprehensive phenotyping of group III and IV muscle afferents in mouse. *Journal of Neurophysiology*, 109: 2374-2381.
- Javdani F., Hegedűs K., Miranda C. O., Hegyi Z., Holló K., Antal M. (2020). Differential expression of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter 1 in neurons and glial cells

within the superficial spinal dorsal horn of rodents. *Scientific Reports*, 10(1): 11715.

- Johnson J., Kotermanski S. (2006). Mechanism of action of memantine. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1): 61-67.
- Jonas R., Prato V., Lechner S. G., Groen G., Obreja O., Werland F., Rukwied R., Klusch A., Petersen M., Carr R. W., Schmelz M. (2020). TTX-resistant sodium channels functionally separate silent from polymodal C-nociceptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14: 13.
- Julius D., Basbaum A. L. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210.
- Jung W. J., Lee S. Y., Choi S. I., Kim B. K., Lee E. J., In K. H., Lee M. G. (2018). Toll-like receptor expression in pulmonary sensory neurons in the bleomycin-induced fibrosis model. *PLoS One*, 13(3): e0193117.
- Kadetoff D., Lampa J., Westman M., Andersson M., Kosek E. (2012). Evidence of central inflammation in fibromyalgia-increased cerebrospinal fluid interleukin-8 levels. *Journal of Neuroimmunology*, 242: 33-38.
- 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.
- Kang R., Chen R., Zhang Q., Hou W., Wu S., Cao L., Huang J., Yu Y., Fan X. G., Yan Z., Sun X., Wang H., Wang Q., Tsung A., Billiar T. R., Zeh H. J., Lotze M. T., Tang D. (2014). HMGB1 in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 40: 1-116.
- Kim D., Myung A. K., Cho I. H., Mi S. K., Lee S., Jo E. K., Choi S. Y., Park K., Jong S. K., Akira S., Heung S. N., Seog B. O. (2007). A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20): 14975-14983.
- Kim H. Y., Park C. K., Cho I. H., Jung S. J., Kim J. S., Oh S. B. (2008). Differential changes in TRPV1 expression after trigeminal sensory nerve injury. *The Journal of Pain*, 9: 280-288.

- Klune J. R., Dhupar R., Cardina, J., Billiar T. R., Tsung A. (2008). HMGB1: endogenous danger signaling. *Molecular Medicine*, 14(7-8): 476-484.
- Krell H. V., Leuchter A. F., Cook I. A., Abrams M. (2005). Evaluation of reboxetine, a noradrenergic antidepressant, for the treatment of fibromyalgia and chronic low back pain. *Psychosomatics*, 46(5): 379-384.
- 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.
- Lacagnina M. J., Watkins L. R., Grace P. M. (2018). Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacology and Therapeutics*, 184: 145-158.
- Lander H. M., Tauras J. M., Ogiste J. S., Hori O., Moss R. A., Schmidt A. M. (1997). Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 17810-17814.
- Latremoliere A., Woolf C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, 10(9): 895-926.
- Lau B. J., Vaughan C. W. (2014). Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Current Opinion in Neurobiology*, 29: 159-164.
- LeBlanc P. M., Doggett T. A., Choi J., Hancock M. A., Durocher Y., Frank F., Nagar B., Ferguson T. A., Saleh M. (2014). An immunogenic peptide in the A-box of HMGB1 protein reverses apoptosis-induced tolerance through RAGE receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 289(11): 7777-86.
- Lee H., Im J., Won H., Nam W., Kim Y. O., Lee S. W., Lee S., Cho I. H., Kim H. K., Kwon J. T., Kim H. J. (2017). Effects of tianeptine on symptoms of fibromyalgia via BDNF signaling in a fibromyalgia animal model. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 21(4): 361-370.

- Lesnak J., Sluka K. A. (2019). Chronic non-inflammatory muscle pain: central and peripheral mediators. *Current Opinion on Physiology*, 11: 67-74.
- Levine J. D., Reichling D. B. (1999). Peripheral mechanisms of inflammatory pain. En Wall P. D., Melzack R. (eds). *Pain Management- Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Churchill Livingstone, China, pp. 59-84.
- Li R., Dai Z., Hu D., Zeng H., Fang Z., Zhuang Z., Xu H., Huang Q., Cui Y., Zhang H. (2020). Mapping the alterations of glutamate using Glu-weighted CEST MRI in a rat model of fatigue. *Frontiers in Neurology*, 11: 589128.
- Li X., Yang H., Ouyang Q., Liu F., Li J., Xiang Z., Yuan H. (2016). Enhanced RAGE expression in the dorsal root ganglion may contribute to neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Pain Medicine*, 17(5): 803-12.
- Liu F., Wang Z., Qiu Y., Wei M., Li C., Xie Y., Shen L., Huang Y., Ma C. (2017). Suppression of MyD88-dependent signaling alleviates neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in the rat. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1): 70.
- Liu Y. T., Shao Y. W., Yen C. T., Shaw F. Z. (2014). Acid-induced hyperalgesia and anxio-depressive comorbidity in rats. *Physiology and Behavior*, 131: 105-110.
- Lohman R. J., Harrison R. S., Ruiz-Gómez G., Hoang H. N., Shepherd N. E., Chow S., Hill T. A., Madala P. K., Fairlie D. P. (2015). Helix-constrained nociceptin peptides are potent agonists and antagonists of ORL-1 and nociception. *Vitamins and Hormones*, 97: 1-55.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lu B., Antoine D. J., Kwan K., Lundbäck P., Wähämaa H., Schierbeck H., Robinson M., Van Zoelen M. A., Yang H., Li J., Erlandsson-Harris H., Chavan S. S., Wang H., Andersson U., Tracey K. J. (2014). JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8): 3068-73.

- Maeda T., Ozaki M., Kobayashi Y., Kiguchi N., Kishioka S. (2013). HMGB1 as a potential therapeutic target for neuropathic pain. *Journal of Pharmacological Sciences*, 123(4): 301-305.
- 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.
- Martinotti S., Patrone M., Ranzato E. (2015). Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer. *Immunotargets and Therapy*, 4: 101-109.
- McMahon S. B., Bennett D. L. H., Bevan S. (2008). Inflammatory mediators and modulators of pain. En McMahon S. B., Koltzenburg M. (eds). *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Elsevier, EUA, pp. 49-72.
- Mendieta D., De la Cruz-Aguilera D. L., Barrera-Villalpando M. L., 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.
- Merenmies J., Pihlaskari R., Laitinen J., Wartiovaara J., Rauvala H. (1991). 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25): 16722-9.
- Merskey H. (1986). Pain terms a current list with definitions and notes on usage. *Pain*, Suppl. 3 (Part II): S217.
- Merskey H., Able-Fessard D., Bonica J. J., Carmon A., Dubner R., Kerr F. W. L., Lindblom U., Mumford J. M., Nathan P. W., Noordenbos W., Pagni C. A., Renner M. J., Sternbach R. A., Sunderland S. (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain*, 6: 249-252.

- Mizel S. B., Honko A. N., Moors M. A., Smith P. S., West A. P. (2003). Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *The Journal of Immunology*, 170: 6217-6223.
- Mòdol L., Cobianchi S., Navarro X. (2014). Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*, 155(8): 1577-1590.
- 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: 116-122.
- Morioka N., Miyauchi K., Miyashita K., Kochi T., Zhang F. F., Nakamura Y., Liu K., Wake H., Hisaoka-Nakashima K., Nishibori M., Nakata Y. (2019). Spinal high-mobility group box-1 induces long-lasting mechanical hypersensitivity through the toll-like receptor 4 and upregulation of interleukin-1 β in activated astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 150: 738-758.
- 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. (2017). Recent advancements in animal models of fibromyalgia. *A Journal of Myofascial Pain and Fibromyalgia*, 23: 104-111.
- 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(1): 26-33.
- Nair M., Jagadeeshan S., Katselis G., Luan X., Momeni Z., Henao-Romero N., Chumala P., Tam J. S., Yamamoto Y., Ianowski J. P., Campanucci V. A. (2021). Lipopolysaccharides induce a RAGE-mediated sensitization of sensory neurons and fluid hypersecretion in the upper airways. *Scientific Reports*, 11(1): 8336.

- Nicholas M., Vlaeyen J. W. S., Rief W., Barke A., Aziz Q., Benoliel R., Cohen M., Evers S., Giamberardino M. A., Goebel A., Korwisi B., Perrot S., Svensson P., Wang S. J., Treede R. D. (2019). IASP taskforce for the classification of chronic pain. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain*, 160(1): 28-37.
- Nishiyori M., Nagai J., Nakazawa T., Ueda H. (2010). Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Neuroscience Letters*, 472(3): 184-187.
- Nishiyori M., Ueda H. (2008). Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Molecular Pain*, 4: 52.
- Nogueira-Machado J. A., de Oliveira Volpe C. A., Veloso C. A., Chaves M. (2011). HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(8): 1023-1035.
- Ohta H., Oka H., Usui C., Ohkura M., Suzuki M., Nishioka K. (2012). A randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled phase III trial to evaluate the efficacy and safety of pregabalin in Japanese patients with fibromyalgia. *Arthritis Research and Therapy*, 14(5): R217.
- Oktayoglu P., Tahtasiz M., Bozkurt M., Em S., Ucar D., Yazmalar L., Mete N., Nas K., Geser 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(4): 403-407.
- Oliveira-Fusaro M. C., Gregory N. S., Kolker S. J., Rasmussen L., Allen L. A. H., Sluka K. A. (2020). P2X4 receptors on muscle macrophages are required for development of hyperalgesia in an animal model of activity-induced muscle pain. *Molecular Neurobiology*, 57(4): 1917-1929.
- 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.

- Pernambuco A. P., Schetino L. P., Alvim C. C., Murad C. M., Viana R. S., Carvalho L. S. C., Reis D. A. (2013). Increased levels of IL-17A in patients with fibromyalgia. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 31(6 Suppl 79): S60-S63.
- Prato V., Taberner F. J., Hockley J., Callejo G., Arcourt A., Tazir B., Hammer L., Schad P., Heppenstall P. A., Smith E. S., Lechner S. G. (2017). Functional and molecular characterization of mechanoinensitive "silent" nociceptors. *Cell Reports*, 21(11): 3102-3115.
- Prescott S. A. (2015). Synaptic inhibition and disinhibition in the spinal dorsal horn. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 131: 359-383.
- Price T. J., Cervero F., de Koninck Y. (2005). Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(6): 547-555.
- 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., Prescott S. A. (2015). Inhibitory regulation of the pain gate and how its failure causes pathological pain. *Pain*, 156: 789-792.
- 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): 259-68.
- 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: 449-458.
- Raja S. N., Carr D. B., Cohen M., Finnerup N. B., Flor H., Gibson S., Keefe F. J., Mogil J. S., Ringkamp M., Sluka K. A., Song X. J., Stevens B., Sullivan M. D., Tutelman P. R., Ushida T., Vader K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain. *Pain*, 10.1097/j.pain.0000000000001939. Advance online publication.
- Ren P. C., Zhang Y., Zhang X. D., An L. J., Lv H. G., He J., Gao C., De Sun X. (2012). High mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia and

spinal astrocytic activation in a mouse model of type 2 diabetes. *Brain Research Bulletin*, 88: 332-337.

- Renthall W. (2014). Pain genetics. En Rosenberg R. N., Pascual J. M. (eds). *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*. Elsevier, EUA, pp. 1089-1100.
- Renthall W. (2020). Pain genetics. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*, 23: 397-410.
- Rong L. L., Trojaborg W., Qu W., Kostov K., Yan S.D., Gooch C., Szabolcs M., Hays A. P., Schmidt A. M. (2004). Antagonism of RAGE suppresses peripheral nerve regeneration. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 18: 1812-1817.
- Rouhiainen A., Kuja-Panula J., Tumova S., Rauvala H. (2013). RAGE-mediated cell signaling. *Methods in Molecular Biology*, 963: 239-63.
- Russell I. J., Vaeroy H., Javors M., Nyberg F. (1992). Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 35(5): 550-556.
- Sakaguchi M., Murata H., Yamamoto K., Ono T., Sakaguchi Y., Motoyama A., Hibino T., Kataoka K., Huh N. H. (2011). TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS One*, 6(8): e23132.
- Sarchielli P., Mancini M. L., Floridi A., Coppola F., Rossi C., Nardi K., Acciarresi M., Pini L. A., Calabresi P. (2007). Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome. *The Journal of Pain*, 8(9): 737-745.
- Schäfers M., Sorkin L. S., Sommer C. (2003). Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain*, 104: 579-588.
- Shah B. S., Burt K. G., Jacobsen T., Fernandes T. D., Alipui D. O., Weber K. T., Levine M., Chavan S. S., Yang H., Tracey K. J. Chahine N. O. (2019). High mobility group box- 1 induces pro- inflammatory signaling in human nucleus pulposus cells via toll- like receptor 4- dependent pathway. *Journal of Orthopaedic Research*, 37: 220-231.

- Shibasaki M., Sasaki M., Miura M., Mizukoshi K., Ueno H., Hashimoto S., Tanaka Y., Amaya F. (2010). Induction of high mobility group box-1 in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *Pain*, 149: 514-521.
- Siddall P., Taylor D., Cousins M. (1997). Classification of pain following spinal cord injury. *Spinal Cord*, 35: 69-75.
- Sims G. P., Rowe D. C., Rietdijk S. T., Herbst R., Coyle A. J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual Review of Immunology*, 28(1): 367-388.
- Skrabek R. Q., Galimova L., Ethans K., Perry D. (2008). Nabilone for the treatment of pain in fibromyalgia. *The Journal of Pain*, 9(2): 164-173.
- Sluka K. A., Clauw D. J. (2016). Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Neuroscience*, 338: 114-129.
- Sluka K. A., Kalra A., Moore S. A. (2001). Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve*, 24: 37-46.
- Snider W. D., McMahon S. B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 20: 629-632.
- Sugimura N., Ikeuchi M., Izumi M., Kawano T., Aso K., Kato T., Ushida T. (2015). Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. *European Journal of Pain*, 19: 629-638.
- Sun J., Fegan P. E., Desai A. S., Madara J. L., Hobert M. E. (2007). Flagellin-induced tolerance of the Toll-like receptor 5 signaling pathway in polarized intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology*, 292(3): G767-78.
- Szelenyi J., Kiss J. P., Puskas E., Szelenyi M., Vizi E. S. (2000). Contribution of differently localized alpha 2- and beta-adrenoceptors in the modulation of TNF-alpha and IL-10 production in endotoxemic mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917: 145-153.
- 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(3): 415-427.

- Tanaka J., Seki Y., Ishikura H., Tsubota M., Sekiguchi F., Yamaguchi K., Murai A., Umemura T., Kawabata A. (2013). Recombinant human soluble thrombomodulin prevents peripheral HMGB1-dependent hyperalgesia in rats. *British Journal of Pharmacology*, 170(6): 1233-41.
- Tanaka J., Yamaguchi K., Ishikura H., Tsubota M., Sekiguchi F., Seki Y., Tsujiuchi T., Murai A., Umemura T., Kawabata A. (2014). Bladder pain relief by HMGB1 neutralization and soluble thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuropharmacology*, 79: 112-118.
- Tanaka M., Nakamura F., Mizokawa S., Matsumura A., Nozaki S., Watanabe Y. (2003). Establishment and assessment of a rat model of fatigue. *Neuroscience Letters*, 352: 159-162.
- Tanga F. Y., Nutile-McMenemy N., DeLeo J. A. (2005). The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(16): 5856-5861.
- Thakur V., Sadanandan J., Chattopadhyay M. (2020). High-mobility group box 1 protein signaling in painful diabetic neuropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3): 881.
- Tian D., Tian M., Zhang L., Zhao P., Cui Y., Li J. (2018). High fat diet sensitizes fibromyalgia-like pain behaviors in mice via tumor necrosis factor alpha. *PLoS One*, 13(2): e0190861.
- Todd A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews*, 11(12): 823-836.
- Todd A. J. (2017). Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. *Molecular Pain*, 13: 1744806917693003.
- Treede R. D., Rief W., Barke A., Aziz Q., Bennett M. I., Benoliel R., Cohen M., Evers S., Finnerup N. B., First M. B., Giamberardino M. A., Kaasa S., Kosek E., Lavand'homme P., Nicholas M., Perrot S., Scholz J., Schug S., Smith

- B. H., Svensson, P., Wang S. J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, 156(6): 1003-1007.
- Treede R. D., Rief W., Barke A., Aziz Q., Bennett M. I., Benoliel R., Cohen M., Evers S., Finnerup N. B., First M. B., Giamberardino M. A., Kaasa S., Korwisi B. Kosek E., Lavand'homme P., Nicholas M., Perrot S., Scholz J., Schug S., Smith B. H., Svensson, P., Vlaeyen J. W.S., Wang S. J. (2019). Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-11). *Pain*, 160(1): 19-27.
 - Tsujita R., Tsubota M., Hayashi Y., Saeki H., Sekiguchi F., Kawabata A. (2018). Role of thrombin in soluble thrombomodulin-induced suppression of peripheral HMGB1-mediated allodynia in mice. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 13: 179-188.
 - Ueda H., Dozono N., Tanaka K., Kaneko S., Neyama H., Uchida H. (2020). Allodynia by splenocytes from mice with acid-induced fibromyalgia-like generalized pain and its sexual dimorphic regulation by brain microglia. *Frontiers in Neuroscience*, 14: 600166.
 - Van Beijnum J. R., Buurman W. A., Griffioen A. W. (2008). Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*, 11: 91-99.
 - Vincent A. M., Perrone L., Sullivan K. A., Backus C., Sastry A. M., Lastoskie C., Feldman E. L. (2007). Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. *Endocrinology*, 148(2): 548-558.
 - Virtanen M. A., Uvarov P., Hübner C. A., Kaila K. (2020). NKCC1, an elusive molecular target in brain development: making sense of the existing data. *Cells*, 9(12): 2607.
 - von Hehn C. A., Baron R., Woolf C. J. (2012). Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*, 73(4): 638-652.
 - Walitt B., Klose P., Fitzcharles M. A., Phillips T., Häuser W. (2016). Cannabinoids for fibromyalgia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7.

- Wallace D. J., Linker-Israeli M., Hallegua D., Silverman S., Silver D., Weisman M. H. (2001). Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology (Oxford)*, 40(7): 743-9.
- Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J. M., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., Manogue K. R., Faist E., Abraham E., Andersson J., Andersson U., Molina P. E., Abumrad N. N., Sama A., Tracey K. J. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285(5425): 248-251.
- Wang H., Buchner M., Moser M. T., Daniel V., Schiltenswolf M. (2009). The role of IL-8 in patients with fibromyalgia. A prospective longitudinal study of 6 months. *Clinical Journal of Pain*, 25: 1-4.
- Wang H., Mei X., Cao Y., Liu C., Zhao Z., Guo Z., Bi Y., Shen Z., Yuan Y., Guo Y., Song C., Bai L., Wang Y., Yu D. (2017). HMGB1/Advanced Glycation End Products (RAGE) does not aggravate inflammation but promote endogenous neural stem cells differentiation in spinal cord injury. *Scientific Reports*, 7(1): 10332.
- Ware M. A., Fitzcharles M. A., Joseph L., Shir Y. (2010). The effects of nabilone on sleep in fibromyalgia: results of a randomized controlled trial. *Anesthesia and Analgesia*, 110(2).
- Weber J., Schley M., Casutt M. (2009). Tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) treatment in chronic central neuropathic pain and fibromyalgia patients: results of a multicenter survey. *Anesthesiology Research and Practice*, 2009: 827290.
- Wei J. Y., Liu C. C., Ouyang H. D., Ma C., Xie M. X., Liu M., Lei W. L., Ding H. H., Wu S. L., Xin W. J. (2017). Activation of RAGE/STAT3 pathway by methylglyoxal contributes to spinal central sensitization and persistent pain induced by bortezomib. *Experimental Neurology*, 296: 74-82.
- Wolfe F., Clauw D. J., Fitzcharles M. A., Goldenberg D. L., Katz R. S., Mease P., Russell A. S., Russell I. J., Winfield J. B., Yunus M. B. (2010). The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for

fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care and Research*, 62: 600-610.

- Wolfe F., Smythe H. A., Yunus M. B., Bennet R. M., Bombardier C., Goldenberg D. L., Tugwell P., Campbell S. M., Abeles M., Clark P. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. *Arthritis Rheumatology*, 33: 160-172.
- 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., Salter M. W. (2000). Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science*, 288(5472): 1765-1768.
- Xu Z. Z., Kim Y. H., Bang S., Zhang Y., Berta T., Wang F., Oh S. B., Ji R. R. (2015). Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nature Medicine*, 21: 1326-1331.
- Yang D., Chen Q., Yang H., Tracey K. J., Bustin M., Oppenheim J. J. (2007). High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1): 59-66.
- Yang J., Yan H. (2017). TLR5: beyond the recognition of flagellin. *Cellular and Molecular Immunology*, 14: 1017-1019.
- 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: 1407-1417.
- Younger J., Mackey S. (2009). Fibromyalgia symptoms are reduced by low-dose naltrexone: a pilot study. *Pain Medicine*, 10(4): 663-672.
- Younger J., Noor N., McCue R., MacKey S. (2013). Low-dose naltrexone for the treatment of fibromyalgia: findings of a small, randomized, double-blind,

placebo-controlled, counterbalanced, crossover trial assessing daily pain levels. *Arthritis and Rheumatism*, 65(2): 529-538.

- Zhang X., Kanter K., Chen J., Kim S., Wang Y., Adeyemi C., O'Buckley S. C., Nackley A. G. (2020). Low catechol-O-methyltransferase and stress potentiate functional pain and depressive behavior, especially in female mice. *Pain*, 161(2): 446-458.
- Zhang X., Xu L., Chen W., Yu X., Shen L., Huang Y. (2020). Pyridoxamine alleviates mechanical allodynia by suppressing the spinal receptor for advanced glycation end product-nuclear factor- κ B/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in diabetic rats. *Molecular Pain*, 16: 1744806920917251.
- Zhou J. R., Zhang L. D., Wei H. F., Wang X., Ni H. L., Yang F., Zhang T., Jiang C. L. (2013). Neuropeptide Y induces secretion of high-mobility group box 1 protein in mouse macrophage via PKC/ERK dependent pathway. *Journal of Neuroimmunology*, 260(1-2): 55-59.
- Zimmermann M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-110.