

Inmunorreactividad antineuronal sérica en pacientes con fibromialgia. Estudio preliminar

Dora L. de la Cruz-Aguilera,¹ Danelia Mendieta-Cabrera,² Citlali E. Rodríguez-Pérez,¹
 Francisco Martínez-Flores,³ María E. Hernández-Gutiérrez,⁴ Enrique Bocerril-Villanueva,⁴
 Gilberto Pérez-Sánchez,⁴ Lenin Pavón-Romero⁴ y Lucinda Aguirre-Cruz^{1*}

¹Laboratorio de Neuroimmunoendocrinología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"; ²Departamento de Genética Psiquiátrica, Investigación Clínica, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz"; ³Programa de Bioterapéutica Molecular, Banco de Piel y Tejidos, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra"; ⁴Laboratorio de Psicoimmunología, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz". Ciudad de México, México

Resumen

Introducción: La fibromialgia (FM) es un síndrome no degenerativo caracterizado por dolor musculoesquelético crónico y generalizado; así como por alteraciones anímicas, de memoria y sueño. **Objetivo:** Buscar anticuerpos antineurales (AANeu) séricos en pacientes con FM para descartar etiología autoinmune. **Métodos:** Se aplicó el Cuestionario de Impacto en Fibromialgia (FIQ) y el Inventory de Depresión de Beck (BDI). La inmunorreactividad y el blanco reconocido por los sueros de pacientes con FM y sujetos sanos se analizó con inmunofluorescencia indirecta y Western blot. **Resultados:** Los valores de FIQ y BDI estuvieron significativamente alterados en los pacientes con FM, en comparación con los de los controles (FIQ, 70 ± 25 versus 12 ± 12 , $p < 0.0001$; BDI, 17 ± 11 versus 4 ± 3 , $p < 0.0002$). Solo cinco de 15 sueros de pacientes con FM tuvieron AANeu dirigidos específicamente contra las neuronas del núcleo vestibular medio del tronco encefálico; estos no se detectaron en los 14 sueros de los controles. Los AANeu reconocieron una proteína de 45 kDa. **Conclusiones:** El 30 % de los pacientes con FM tiene AANeu no descritos antes. Será necesario evaluar la inmunorreactividad antineuronal en una muestra más grande y determinar el papel de los AANeu en la fisiopatología de la FM.

PALABRAS CLAVE: Fibromialgia. Anticuerpos antineurales. Núcleo vestibular medial. Autoinmunidad.

Serum anti-neural immunoreactivity in patients with fibromyalgia. Preliminary study

Abstract

Introduction: Fibromyalgia (FM) is a non-degenerative syndrome characterized by generalized, chronic musculoskeletal pain, as well as mood, memory and sleep disorders. **Objective:** To search for serum anti-neural antibodies (ANeuA) in patients with FM (FMP) in order to rule out autoimmune etiology. **Methods:** The Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) and BECK's depression inventory (BDI) were applied. Immunoreactivity and the target recognized on the sera from FMPs and healthy subjects were analyzed by indirect immunofluorescence and Western blot. **Results:** Both FIQ and BDI values were significantly altered in FMPs in comparison with those of controls (FIQ, 70 ± 25 vs. 12 ± 12 , $p < 0.0001$; BDI, 17 ± 11 vs. 4 ± 3 , $p < 0.0002$). Only five out of 15 FMP sera had ANeuA specifically directed against neurons from the medial vestibular nucleus of the brainstem. This immunoreactivity was not detected in the sera from the 14 controls. ANeuA recognized a 45 kDa protein. **Conclusions:** 30% of FMPs have ANeuA that have not been described before. In future studies, it will be necessary for anti-neural immunoreactivity to be determined in a larger sample and for the role of ANeuAs in the pathophysiology of FM to be established.

KEYWORDS: Fibromyalgia. Anti-neural antibodies. Medial vestibular nucleus. Autoimmunity.

Correspondencia:

*Lucinda Aguirre-Cruz

E-mail: mariluci_aguirre@hotmail.com

0016-3813/© 2021 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 06-10-2021

Fecha de aceptación: 14-12-2021

DOI: 10.24875/GMM.21000638

Gac Med Mex. 2022;158:108-114

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

Introducción

La fibromialgia (FM) es un síndrome no degenerativo caracterizado por dolor no articular, crónico, musculoesquelético, con evolución de más de tres meses e hipersensibilidad en sitios anatómicos definidos.¹ En 1992, la Organización Mundial de la Salud la reconoció como una enfermedad independiente.² Su diagnóstico clínico se hace con base en los criterios del Colegio Americano de Reumatología.^{3,4} Se presenta en 2 a 5 % de la población mundial, con predominio en mujeres.⁵ En América Latina y México es causa frecuente de consulta reumatológica.⁶ Se acompaña de alteraciones del sueño, fatiga, ansiedad, depresión, parestesias, cefalea, colon irritable y cistitis.⁷

La etiología de la FM es desconocida, pero se sugiere que la capacidad disminuida para responder adecuadamente a estímulos (emociones, traumas físicos e infecciones) se asocia a anomalías del sistema nervioso central.^{8,9}

La FM comparte sintomatología con algunas condiciones autoinmunes y puede coexistir con lupus eritematoso sistémico (de 22 a 33 %), tiroiditis (30 %), esclerosis múltiple (17.3 %), síndrome de Sjögren (de 12 a 55 %) y artritis reumatoide (7.4 %).¹⁰ Estudios del perfil inmunológico en pacientes con FM reportan niveles anormales de citocinas proinflamatorias, principalmente de IL-6 e IL-8 y quimiocinas (por ejemplo, MCP-1, MIG, MDC, I-TAC, TARC y eotaxina), así como disminución en la expresión de moléculas de adhesión (por ejemplo, CD62L y CD11b/CD18) y respuesta inmune celular deficiente.¹¹ Actualmente, no hay biomarcadores específicos para FM, pero se ha reportado la presencia de autoanticuerpos contra proteínas nucleares (por ejemplo, ANA, anti-68/48 kDa), proteínas tiroideas (por ejemplo, tiroperoxidasa y tiroglobulina), canales de potasio, anticuerpos antipolímero, 5-hidroxitriptamina, gangliósidos, fosfolípidos y antianexina V.¹²

En este estudio investigamos la existencia de anticuerpos antineurales en el suero de pacientes con FM.

Métodos

Se estudiaron 15 pacientes con FM, sin enfermedad autoinmune ni historia de reacciones alérgicas, manifestaciones de infección activa, cirugía reciente, hipertensión arterial, diabetes mellitus, embarazo, desórdenes antisuicidas o tratamiento con agentes inmunosupresores; y

14 voluntarios sanos (controles). Los pacientes fueron reclutados del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" entre 2009 a 2011 y diagnosticados con base en los criterios del Colegio Americano de Reumatología.^{3,4} El Cuestionario de Impacto de la Fibromialgia (FIQ)^{13,14} y el Inventory de Depresión de Beck (BDI)¹⁵ se aplicaron a pacientes y controles. El estudio fue aprobado por los comités de investigación y ética del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" (INPRFM-SC-2329) y todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

Sueros

Por venopunción, de cada sujeto fueron recolectados en un tubo 8 mL de sangre para la separación del suero (Tubos BD Vacutainer SST, New Jersey, Estados Unidos); fueron incubados una hora a 37 °C para que se formara el coágulo y se centrifugaron a 1125x g a 4 °C durante 15 minutos. El suero fue separado en aliquotas y almacenado a -80 °C hasta su uso.

Perfusión de ratones, obtención y congelación de tejidos del sistema nervioso central

Ratones macho BALB/c de 20 g fueron anestesiados con ketamina (80 mg/kg vía intraperitoneal) y xilacina (10 mg/kg vía intraperitoneal). Bajo anestesia profunda, los animales se perfundieron secuencialmente con 15 mM de amortiguador de fosfatos y paraformaldehído a 4 %. Los cerebros perfundidos se extrajeron de los animales y se colocaron en paraformaldehído a 4 % por tres horas para fijarlos. Posteriormente se colocaron en sacarosa a 20 % durante toda la noche y se embebieron en resina (Tissue-Tek OCT, Sakura Finetek, California, Estados Unidos) para proteger el tejido cerebral y se congelaron en isopentano a -70 °C por 15 segundos. Se realizaron cortes sagitales de cinco micras de cerebro, cerebelo y tallo cerebral, que fueron montados en portaobjetos silanizados y fueron congelados a -20 °C hasta el momento de su uso. Los animales se manejaron con estricto apego a los estándares éticos internacionales.

Método de inmunofluorescencia indirecta

Cien microlitros de suero de pacientes con FM y controles se adsorberon en polvo de hígado (Guinea

Pig Liver, Rockland Immunochemical Inc., Pensilvania, Estados Unidos) por 24 horas para eliminar la tinción de fondo. Los sueros adsorbidos se separaron y diluyeron (1:50) con solución de bloqueo (solución salina amortiguadora de fosfatos 15 mM y adicionada con suero de cabra a 10 %) diluida 1:10. Los cortes se incubaron secuencialmente en la obscuridad durante una hora a temperatura ambiente, en 200 µL de suero de los pacientes con FM y de los sujetos control (dilución 1:50 en RB 1:10) y anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Goat Anti-Human IgG Fluorescein Conjugate, Southern Biotech, Pensilvania, Estados Unidos), dilución 1:200 en RB 1:10. Entre cada incubación, los cortes se lavaron tres veces con solución PBS. Las preparaciones fueron adicionadas con medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories, California, Estados Unidos) y analizadas en microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, Axio Image D2 model).¹⁶

Extracto de proteínas de tronco encefálico de ratón

Diez ratones adultos BALB/c se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg vía intraperitoneal). Los cerebros fueron extraídos y los tallos cerebrales disecados² y homogenizados a 4 °C en amortiguador de lisis (amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación: Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NaF 50 mM, PMSF 1 mM, SDS 0.1 %, desoxicolato de sodio 0.5 % e IGEPAL 1 %), suplementado con inhibidor de proteasa completo 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, Estados Unidos), GeneTex Protocol. La suspensión fue centrifugada a 10 000x g durante 10 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, Estados Unidos) en curva de calibración de albúmina.^{17,18}

Western blot¹⁹

- *Electroforesis:* se hizo en sistema discontinuo con gel de separación (SDS-PAGE: 12.5 % de acrilamida en una solución de Tris-HCl 1.5 M con 0.4 % de SDS, pH 8.8,) y gel de concentración (3 % de acrilamida en una solución de Tris-HCl 0.5 M con 0.4 % de SDS, pH 6.8). Treinta miligramos de extracto total de tronco encefálico se adicionaron con 2-mercaptopetanol 2X, vol.:vol.

(Laemmli 2X Sample Buffer, Bio-Rad, California, Estados Unidos), con concentración final 1X de 355 mM. La muestra se hirvió durante cinco minutos y se colocó en el gel. La electroforesis se hizo con equipo Mini-protean de Bio-Rad a 180 V durante 45 minutos.

- *Electrotransferencia:* las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas en las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, California, Estados Unidos) durante dos horas a 100 V en una cámara de transferencia húmeda. Como marcador de peso molecular se empleó un estándar de doble color de proteínas de 10 a 250 kDa (Bio-Rad, California, Estados Unidos).
- *Inmunoblot:* las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se lavaron tres veces con solución PBS-T: PBS 15 mM, pH 7.4-Tween 20 a 0.05 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, Estados Unidos). Se incubaron durante una hora con solución de bloqueo (leche semidescremada a 5 % en solución PBS 15 mM); se volvieron a lavar con PBS-T y se cortaron en tiras. Las tiras de membranas de nitrocelulosa se incubaron secuencialmente con suero de pacientes con FM y de sujetos control (dilución 1:100 en solución de bloqueo 1:3) y anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano (Goat Anti-human IgG H&L, HRP, Abcam, Massachusetts, Estados Unidos), dilución 1:5000 en RB 1:3, durante 18 horas a 4 °C. Entre cada incubación, las membranas de nitrocelulosa se lavaron tres veces con PBS-T. Finalmente, se les adicionó substrato de peroxidasa de rábano quimioluminiscente (Novex ECL, Invitrogen, California, Estados Unidos) y se obtuvieron las autorradiografías colocando las membranas de nitrocelulosa en contacto con películas radiográficas (BioMax Film, GE Healthcare, Amersham, California, Estados Unidos).

Resultados

Valores de las pruebas de FIQ y BDI

Los pacientes con FM tuvieron valores promedio de IFQ y de BDI significativamente mayores a los de los sujetos control ($p < 0.0002$ y $p < 0.0001$, respectivamente), los cuales se describen en la Tabla 1, que correspondieron a impacto severo de síntomas relacionados con FM y disfunción, así como a grado leve a moderado de depresión. Los valores de IFQ y BDI en los controles fueron normales.

Tabla 1. Características demográficas y valores de escalas clínicas en pacientes con FM y voluntarios sanos

Voluntarios sanos (n = 14)				Pacientes con FM (n = 15)			
Características demográficas		Valores de escalas clínicas		Características demográficas		Valores de escalas clínicas	
Edad (años)	Sexo masculino/femenino	FIQ	BDI	Edad (años)	Sexo masculino/femenino	FIQ	BDI
41 ± 4	2/12	12 ± 12	4 ± 3	43 ± 8	1/15	70 ± 25**	17 ± 11*

FIQ: Cuestionario de Impacto de Fibromialgia; BD: Inventario de Depresión de Beck. *p < 0.0001; **p < 0.0002.

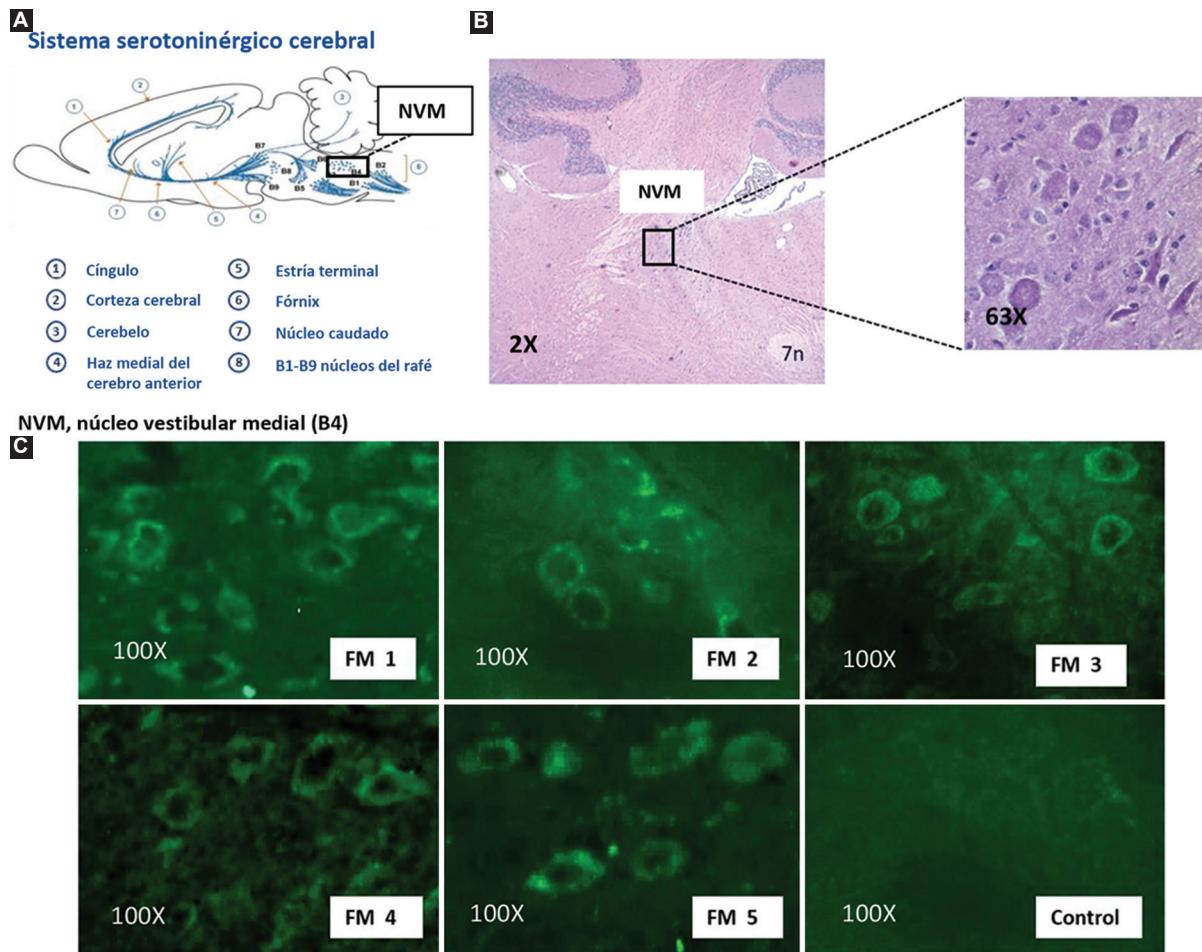


Figura 1. Sistema serotoninérgico cerebral e inmunorreactividad del suero de pacientes con fibromialgia comparado con las neuronas del núcleo vestibular medial de ratón, reveladas por inmunofluorescencia indirecta. **A:** representación esquemática del sistema serotoninérgico, que se origina en los núcleos del rafé del tronco encefálico. El recuadro muestra el núcleo vestibular medial (B4), que forma parte de los nueve núcleos del rafé (B1-B9). **B:** foto izquierda, imagen microscópica de corte sagital de tronco encefálico, teñido con hematoxilina y eosina (2x), en la que se observa la localización del núcleo vestibular medial (NVM) en relación con el séptimo nervio craneal (7n); foto derecha, amplificación del NVM (63x). **C:** imágenes microscópicas (100x) en las que se observa la fluorescencia de las neuronas del NVM del tronco encefálico de ratón al reaccionar con el suero de cinco pacientes con FM (FM1-FM5); y ausencia de tinción fluorescente del NVM cuando utilizó el suero de un individuo sano (control).

Inmunorreactividad antineuronal

Cinco de los 15 pacientes con FM presentaron inmunorreactividad sérica selectiva contra las neuronas del núcleo vestibular medial o núcleo magno, las cuales constituyen un grupo de neuronas productoras

de serotonina que forman parte de los núcleos del rafé del tronco encefálico, implicadas en los procesos de inhibición del dolor, mantenimiento y regulación del estado de ánimo y control de ciertos comportamientos agresivos. Esta inmunorreactividad no se encontró en el suero de los sujetos control (Figura 1).

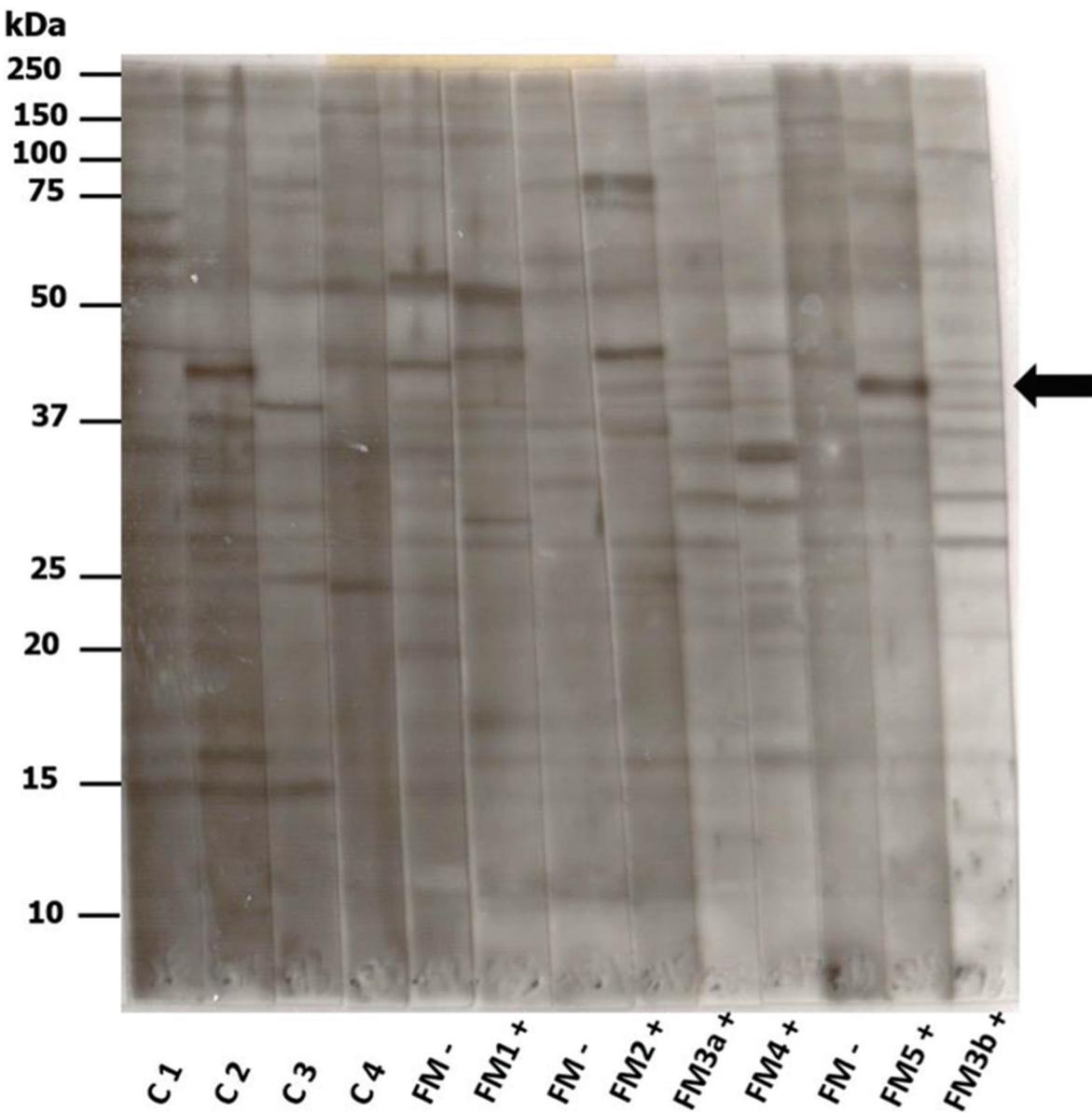


Figura 2. El suero de voluntarios sanos (C1-C4) y de cinco pacientes con fibromialgia y anticuerpos antinúcleo vestibular medial (FM+) o sin ellos (FM-), se incubaron con proteínas totales del tronco encefálico de ratón. FM3a+ y FM3b+ corresponden a dos muestras de suero diferentes del mismo paciente. A la izquierda se indica la migración de proteínas de peso molecular conocido de 10 a 250 kDa. La flecha apunta a la proteína de 45 kDa, revelada por los sueros con anticuerpos anticitoplasma de las neuronas del núcleo vestibular medial.

Western blot

Los sueros de los pacientes con FM con inmunorreactividad selectiva contra el núcleo vestibular medial reconocieron una proteína de 45 kDa, que no fue reconocida por los sueros de los sujetos control (Figura 2).

Discusión

Los pacientes con FM tuvieron un impacto severo en su calidad de vida y capacidad funcional, así como

depresión de leve a moderada, que no presentaron los controles. Estos resultados son similares a los reportados en otras investigaciones.²⁰

Este es el primer estudio que reporta anticuerpos antinúcleo vestibular medial en pacientes con FM sin enfermedad autoinmune asociada, los cuales pudieran estar relacionados con el desarrollo de algunos síntomas neurológicos tales como ansiedad, depresión y sueño no reparador.²¹

Las neuronas del núcleo vestibular medial del tallo cerebral forman parte de los núcleos del rafé que

integran el sistema serotoninérgico, encargado de regular emociones, estados de ánimo, conductas agresivas y sexuales, sueño e información nociceptiva, a través de proyecciones que descienden a la médula espinal o ascienden al cerebro anterior.²²

La FM es una enfermedad polifacética idiopática en la que participan mecanismos de autoinmunidad, neuroinflamación y neuropatía de fibras pequeñas.²³ Los hechos que hacen pensar en la participación de un componente autoinmune en la FM incluyen los antecedentes comunes de trauma o infección, que pueden desencadenar autoinmunidad; predominio en las mujeres, lo cual coincide con lo encontrado en otras condiciones autoinmunes; hallazgo de autoanticuerpos contra diferentes blancos, estados inflamatorios que podrían favorecer un componente autoinmune y expresión de perfiles genéticos de firmas típicas de enfermedad autoinmune (Th-17 e interferón tipo I).^{24,25}

Así, los autoanticuerpos contra el núcleo vestibular medial podrían interferir en el funcionamiento del sistema serotoninérgico y repercutir en la fisiopatología de la FM.

En 2021, Goebel *et al.* reportaron que ratones tratados con IgG de pacientes con FM presentaron sensibilidad aumentada a estímulos mecánicos o al frío, que no mostraron los animales tratados con sueros de pacientes con FM depletados de IgG o sueros con IgG de sujetos control sanos, lo cual indica posible participación de los anticuerpos antineurales en el desarrollo de síntomas de FM, lo cual se relaciona con lo informado en esta investigación.²⁶

Conclusiones

Los pacientes con FM tienen alteraciones que repercuten en sus actividades diarias y cursan con un grado de depresión.

Los resultados de este estudio evidencian por primera vez inmunorreactividad contra el núcleo vestibular medial del tronco encefálico en 33 % de los pacientes con FM, lo cual indica la participación de un componente autoinmune en la fisiopatología de la FM. Será necesario estudiar un mayor número de pacientes para confirmar la relevancia clínica de este hallazgo y esclarecer la repercusión funcional de los resultados obtenidos, así como clonar la proteína de 45 kDa de las neuronas del núcleo vestibular medial y determinar cuál es su función.

Agradecimientos

Agradecemos a Hugo Viadas López, por su ayuda técnica en la obtención y preparación del tejido

nervioso central de ratón con el que se llevó a cabo la inmunofluorescencia indirecta.

Financiamiento

Los autores declaran no haber contado con financiamiento externo para la realización de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se hicieron conforme a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que siguieron los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores obtuvieron el consentimiento informado de los sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Bibliografía

1. Borchers AT, Gershwin ME. Fibromyalgia: a critical and comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol. 2015;49:100-151.
2. Bellato E, Marini E, Castoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE, et al. Fibromyalgia syndrome: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. Pain Res Treat. 2012;2012:426130.
3. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. Arthritis Rheum. 1990;33:160-172.
4. Wolfe F, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Häuser W, Katz RL, Mease PJ, et al. Comparison of physician-based and patient-based criteria for the diagnosis of fibromyalgia. Arthritis Care Res. 2016;68:652-659.
5. Heidari, F. Afshari M, Moosazadeh M. Prevalence of fibromyalgia in general population and patients, a systematic review and meta-analysis. Rheumatol Int. 2017;37:1527-1539.
6. Peláez-Ballestas I, Sanín LH, Moreno-Montoya J. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. J Rheumatol. 2011;38:3-8.
7. Consoli G, Marazziti D, Ciapparelli A. The impact of mood, anxiety, and sleep disorders on fibromyalgia. Compr Psychiatry. 2021;53:962-907.
8. Becker S, Schweinhardt P. Dysfunctional neurotransmitter systems in fibromyalgia, their role in central stress circuitry and pharmacological actions on these systems. Pain Res Treat. 2012;2012:1-10.
9. Kia S, Choy E. Update on treatment guideline in fibromyalgia syndrome with focus on pharmacology. Biomedicines. 2017;5:1-24.
10. El-Rabbat MS, Mahmoud NK, Gheita TA. Clinical significance of fibromyalgia syndrome in different rheumatic diseases: relation to disease activity and quality of life. Reumatol Clin (Engl Ed). 2018;14:285-289.
11. Mendieta D, de la Cruz-Aguilera DL, Barrera-Villalpando MI, Becerril-Villanueva E, Areolla R, Hernández-Ferreira E, et al. IL-8 and IL-6 primarily mediate the inflammatory response in fibromyalgia patients. J Neuroimmunol. 2016;290:22-25.

12. Greenbaum H, Weil C, Chodick G, Shalev V, Eisenberg VH. Evidence for an association between endometriosis, fibromyalgia, and autoimmune diseases. *Am J Reprod Immunol.* 2019;81:e13095.
13. Burckhardt CS, Clark SR, Bennett RM. The fibromyalgia impact questionnaire: development and validation. *J Rheumatol.* 1991;18:728-733.
14. Salgueiro M, García-Leiva JM, Ballesteros J, Hidalgo J, Molina R, Ca-landre EP. Validation of a Spanish version of the Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR). *Health Qual Life Outcomes.* 2013;11:132.
15. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1961;4:561-571.
16. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* 2004;364:2106-2112.
17. Spijker S. Dissection of rodent brain regions. En: Li K, editor. *Neuroproteomics. Neuromethods.* Vol 57. EE. UU.: Humana Press; 2011.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
19. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 1979;76:4350-4354.
20. Ubago-Linares MC, Ruiz-Pérez I, Bermejo Pérez MJ, de Labry-Lima AO, Hernández-Torres E, Plazaola-Castaño J. Analysis of the impact of fibromyalgia on quality of life: associated factors. *Clin Rheumatol.* 2008;27:613-619.
21. Consoli G, Marazziti D, Ciapparelli A, Bazzichi L, Massimetti G, Giacomelli C, et al. The impact of mood, anxiety, and sleep disorders on fibromyalgia. *Compr Psychiatry.* 2012;53:962-967.
22. Monti JM. The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Med Rev.* 2010;14:307-317.
23. Ryabkova VA, Churilov LP, Shoenfeld Y. Neuroimmunology: what role for autoimmunity, neuroinflammation, and small fiber neuropathy in fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, and adverse events after human papillomavirus vaccination? *Int J Mol Sci.* 2019;20:5164.
24. Buskila D, Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Etiology of fibromyalgia: the possible role of infection and vaccination. *Autoimmun Rev.* 2008;8:41-43.
25. Dolcino M, Tinazzi E, Puccetti A, Lunardi C. Gene expression profiling in fibromyalgia indicates an autoimmune origin of the disease and opens new avenues for targeted therapy. *J Clin Med.* 2020;9:1814.
26. Goebel A, Krock E, Gentry C, Israel MR, Jurczak A, Urbina CM, et al. Passive transfer of fibromyalgia symptoms from patients to mice. *J Clin Invest.* 2021;131:e144201.