



APLICACIÓN DE CORRIENTES GALVÁNICAS INTRAMUSCULARES EN RATONES CON PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES

Joan Ramon Margalef Perez

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

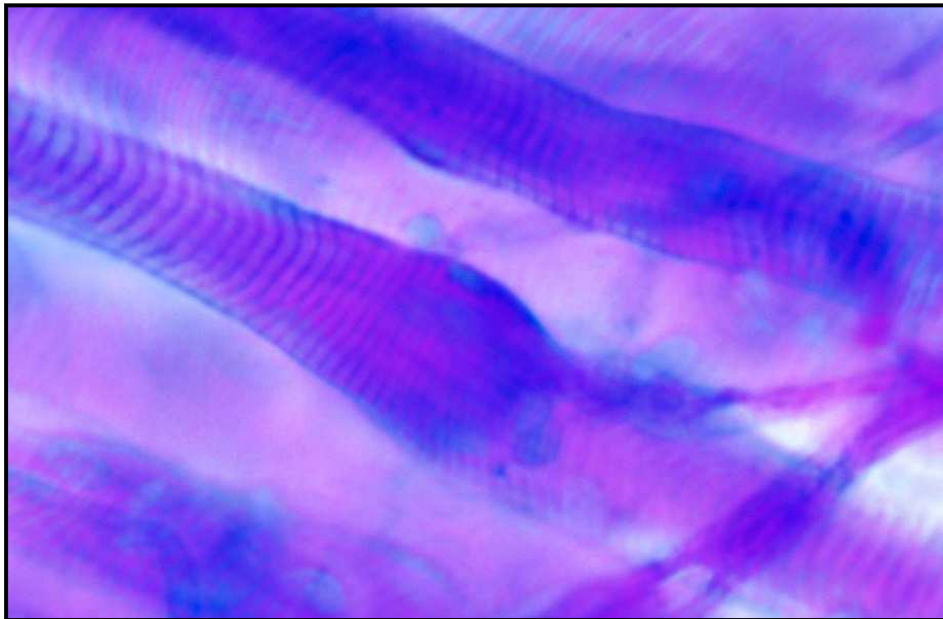
WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

APLICACIÓN DE CORRIENTES GALVÁNICAS INTRAMUSCULARES EN RATONES CON PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES

JOAN RAMON MARGALEF PÉREZ



TESIS DOCTORAL

2021

Microfotografía de la portada: tinción PAS-azul alcian, de tejido muscular con ramificación intramuscular del nervio. Se pueden identificar los sarcómeros contracturados, por el acercamiento de las bandas de actina (oscuras) y miosina (claras) y la zona de contacto sináptico. La tinción rosa indica la presencia de glucosaminoglicanos (GAGs) neutrales y la tinción azul GAGs ácidos, 30 minutos posteriores a la administración de neostigmina.

Joan Ramón Margalef Pérez

APLICACIÓN DE CORRIENTES GALVÁNICAS INTRAMUSCULARES EN RATONES CON PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES

TESIS DOCTORAL

dirigida por:

Dr. Manel Santafé



**Unidad de Histología y Neurobiología
Departamento de Ciencias Médicas Básicas
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

Reus, 2021



*Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat Rovira i Virgili*

Hago constar que el presente trabajo titulado "APLICACIÓN DE CORRIENTES GALVÁNICAS INTRAMUSCULARES EN RATONES CON PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES", que presenta Joan Ramón Margalef Pérez, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Ciencias Médicas Básicas de esta universidad y cumple todos los requerimientos necesarios para la obtención del título de Doctor.

Reus, 14 de junio de 2021

El director de la tesis doctoral


Dr. Manel M. Santafé

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Manel Santafé la oportunidad por poder trabajar junto a él, formarme en su laboratorio y desarrollar los trabajos que componen esta tesis. Su tutela y pasión por aprender día tras día, siempre me motivan a mejorar. Igualmente agradezco a la Dra. Teresa Colomina su apoyo durante estos años de trabajo. Gracias a los dos, por compartir vuestro tiempo conmigo, dentro y fuera de la universidad.

Un gracias especial es para mi esposa Patricia Medina, a quién conocí en el laboratorio y desde entonces nunca nos hemos separado. Sus conocimientos y experiencia investigadora han sido esenciales para mí y su apoyo incondicional me ha impulsado a seguir mejorando día a día para culminar este proyecto tan importante.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, en primer lugar, a la Dra. Mercedes Priego, quién me enseñó los primeros protocolos y me ayudo a iniciar este camino. Mil gracias a mis grandes compañeros Marc Bosque y Marc Sisqueña, con quién hemos hecho crecer este proyecto y hemos compartido fantásticos momentos dentro y fuera del laboratorio. También agradezco a Aida, Grisel y Camila su apoyo durante el tiempo que compartimos. Gracias también a todas y todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio a quienes he ayudado a aprender y sin ninguna duda me han hecho mejorar a mí.

Doy las gracias al Dr. Fermín Valera y Dr. Francisco Minaya por compartir conmigo sus conocimientos, proyectos y hacer posible los trabajos que componen esta tesis. Gracias a Pedro Flores por poder trabajar juntos y compartir su experiencia en el manejo de la ecografía.

También quiero agradecer a la Dra. Neus García y a sus colaboradores por ayudarme siempre que lo necesité. Agradezco al personal del estabulario, por el trabajo constante e importantísimo para poder llevar a cabo el trabajo de investigación.

Por supuesto agradezco a mi familia a la que, durante estos años de estudio y trabajo, no he dedicado el tiempo que se merecen. Gracias por vuestra comprensión y apoyo incondicional. Tampoco falta mi agradecimiento a todos mis amigos por su apoyo durante estos años.

Y a mi hijo Oliver y mi sobrino Martí, espero poder enseñaros todo lo que pueda y que algún día elijáis el camino que elijáis, mi experiencia os sirva para vivir bien y feliz.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ACRÓNIMOS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. SÍNDROME DE DOLOR MIOFASCIAL.	11
1.2. ETIOLOGÍA DE LOS PGM.	11
1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LOS PGM: HIPÓTESIS INTEGRADA.	12
1.4. SINAPSIS NEUROMUSCULAR.	13
1.5. ANÁLISIS DE LAS EVIDENCIAS DE LOS MECANISMOS DESCRITOS EN LA HIPÓTESIS INTEGRADA.	15
1.6. RESPUESTA DE ESPASMO LOCAL.	19
1.7. MODELOS ANIMALES DE PGM.	20
1.8. TRATAMIENTO DEL SDM.	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
2.1. HIPÓTESIS GENERAL.	27
2.2. OBJETIVOS GENERALES.	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS	28
3.1. ANIMALES Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.	29
3.2. ADMINISTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTICOLINESTERÁSICOS.	29
3.3. MODELOS MUSCULARES.	30
3.4. REGISTRO INTRACELULAR.	30
3.5. REGISTRO ELECTROMIOGRAFICO	35
3.6. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.	36
3.7. ESTUDIO ECOGRÁFICO.	38
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	39
4. RESULTADOS	40
4.1. ARTICULO 1 EXPERIMENTAL MYOFASCIAL TRIGGER POINT CREATION IN RODENTS.	41
4.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ARTÍCULO 1.	42
4.2. ARTICULO 2 PERCUTANEOUS APPLICATION OF GALVANIC CURRENT IN RODENTS REVERSES SIGNS OF MYOFASCIAL TRIGGER POINTS.	53
4.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ARTICULO 2.	54
4.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS ESPECÍFICOS DEL ARTÍCULO 2.	55

4.3. ARTICULO 3 SAFETY ANALYSIS OF PERCUTANEOUS NEEDLE ELECTROLYSIS: A STUDY OF NEEDLE COMPOSITION, MORPHOLOGY, AND ELECTRICAL RESISTANCE.	65
4.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ARTÍCULO 3.	66
4.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS ESPECÍFICOS DEL ARTÍCULO 3.	67
5. DISCUSIÓN GENERAL	76
5.1. AUMENTO DE LOS MEEPS POR ACCIÓN DE LA NEOSTIGMINA.	78
5.2. CORRIENTES GALVANICAS Y MEEPS.	78
5.3. RUIDO DE PLACA Y LOS PGM.	79
5.4. LA UNIÓN NEUROMUSCULAR Y EL NÓDULO DE CONTRACCIÓN.	81
5.5. GLUCOSAMINOGLICANOS Y PGM.	84
5.6. RESPUESTA DE ESPASMO LOCAL.	85
5.7. TEMPERATURA, MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LAS AGUJAS UTILIZADAS EN LA APLICACIÓN INTRAMUSCULAR DE CORRIENTE GALVANICA.	86
6. CONCLUSIONES	88
7. BIBLIOGRAFÍA	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Línea cronológica de las técnicas utilizadas sucesivamente para el desarrollo del modelo animal con PGM.

Figura 2. Equipo básico de electrofisiología de registro intracelular

Figura 3. Ejemplo de registro de los potenciales de placa en miniatura (MEEPs).

Figura 4. Procedimiento de EMG

Figura 5. Electromiografía.

Figura 6. Estudio ecográfico para identificar los signos clínicos de los PGM

ACRÓNIMOS

α-BTX	Alfa-Bungarotoxina
ATP	Adenosina trifosfato.
ACh	Acetilcolina del inglés <i>Acetylcholine</i>
AChE	Acetilcolinesterasa del inglés <i>Acetylcholinesterase</i>
AChR	Receptores de Acetil colina del inglés <i>Acetylcholine receptor(s)</i>
CG	Corriente Galvánica
CGI	Corriente Galvánica Intramuscular
EMG	Electromiografía
EPP	Potencial de Placa terminal del inglés <i>End plate potential</i>
GAGs	Glucosaminoglicanos
Hz	Hercios
LAL	Levatur Auris Longus
mA	miliamperios
mg	miligramo (10 ⁻³)
MEPP	Potencial de placa en Miniatura del inglés <i>Miniature end plate potential</i>
ms	milisegundo
mV	Milivoltios (10 ⁻³ V)
NTG	Neostigmina
PGM	Punto Gatillo Miofascial
PS	Punción Seca
REL	Respuesta de Espasmo Local
RP	Ruido de Placa
SDM	Síndrome Dolor Miofascial
SNMs	Sinapsis Neuromuscular/es

RESUMEN

El síndrome de dolor miofascial y su protagonista el punto gatillo (PGM) ha sido el foco de interés científico por ser uno de los responsables de generar dolor y disfunción en la musculatura esquelética en personas. El PGM consiste en un nódulo contracturado, palpable en el musculo esquelético. Según la hipótesis integrada, una neurotransmisión espontanea elevada en una o varias uniones neuromusculares (UNMs) puede estar relacionada con la aparición de estos nódulos. En esta tesis, mediante fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (anti-AChE) se ha generado un aumento de acetilcolina (ACh) en la hendidura sináptica de las UNMs de los músculos diafragma y LAL de ratones Swiss y ratas Sprague Dawley. Mediante registros intracelulares se observó un gran incremento de la neurotransmisión espontánea (MEEPs) en el musculo *levator auris longus* y, en menor medida, en el diafragma. Igualmente, los registros electromiográficos de gastrocnemios, presentaron un incremento del ruido de placa (RP). Estos cambios están asociados a una reducción del área de los receptores de ACh, la identificación de nódulos contracturados próximos a las UNMs y un aumento de glucosaminoglicanos. En un segundo set de experimentos se administró anti-AChE en ratas y se identificaron bandas tensas palpables y mediante ecografía, respuestas de espasmo local (REL), después de estimular los PGM con una aguja, consiguiendo reproducir los signos de los PGM descritos en los humanos.

El siguiente paso fue evaluar si la aplicación de corrientes galvánicas intramusculares (CGI), también conocida como electrolisis percutánea musculoesquelética (EPM) o electrolisis percutánea intratisular (EPI), en este modelo animal puede revertir los signos de PGM. Se administró CGI a través de agujas, sobre los músculos con PGM y se observó que los protocolos 1.5mA durante 5 segundos y 3 aplicaciones y 3 mA durante 3 segundos y 3 aplicaciones (3/3/3) fueron los más efectivos para revertir los registros electrofisiológicos elevados. Además, la CGI generó un mayor número de RELs y de mayor velocidad que la simple inserción de la aguja en los PGM.

En último lugar se evaluó si esta forma de tratamiento de los PGM, insertar una aguja solida en los músculos para aplicar la corriente galvánica (CG), es seguro para los pacientes. En la literatura científica esta descrito que la administración de las CG a través de agujas solidas en los tejidos biológicos puede generar un aumento de la temperatura, un deterioro de la morfología y compuestos de las agujas. Para ello, se evaluó el protocolo de 3mA durante 3 segundos repetido 3 veces. La temperatura se analizó sumergiendo las agujas Physio Invasiva® y AguPunt® en tubos de Ringer y los cambios en la resistencia eléctrica con un multímetro. La morfología de las agujas se estudió mediante un microscopio electrónico de superficie y su composición mediante la difusión de rayos X. Los resultados no mostraron cambios de temperatura ni de pH ni de resistencia ni tampoco en la composición y morfología. Sin embargo, si pueden causar deterioro de la morfología y composición de los materiales, si

se aumenta el número de aplicaciones. Es decir que esta técnica, aplicada en los parámetros habituales, es completamente segura en humanos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SÍNDROME DE DOLOR MIOFASCIAL.

El síndrome de dolor miofascial (SDM) es una forma de dolor muscular que se define como el conjunto de signos y síntomas causados por los puntos gatillo miofasciales (PGM)¹. Los PGM consisten en un nódulo o área hiperirritable asociados a una banda tensa en el músculo esquelético^{1,2}. La banda tensa es un conjunto de fibras musculares que presentan una mayor consistencia, en comparación a otras fibras del mismo músculo que al ser estimuladas durante su exploración y tratamiento, provocan la aparición de dolor local y, en algún caso, dolor referido a otra zona que el paciente reconoce como su dolor habitual. Además durante la exploración de la banda tensa se puede provocar una contracción espontánea, denominada respuesta de espasmo local (REL) que puede agravar los síntomas anteriormente descritos^{3,4}. Además, la presencia de la banda tensa puede comprometer el funcionamiento de las fibras afectadas, ya que, la tensión generada se transmite a lo largo del tejido, llegando a la unión miotendinosa, que con el paso del tiempo acaba afectando a la capacidad del músculo para generar fuerza y movimiento del segmento⁵. La disfunción muscular creada por los PGM se caracteriza, por acortamiento, debilidad, fatigabilidad, descoordinación, inhibición propia y referida y dificultad para relajarse¹. Los PGM pueden ser activos o latentes, en ambas categorías generan disfunción, pero sólo los activos producen dolor espontáneo en el paciente.

1.2. ETIOLOGÍA DE LOS PGM.

Travell y Simons^{1,6} describieron que el inicio de esta situación dolorosa puede estar asociado a una situación de sobrecarga muscular aguda o crónica, por lo tanto, no es difícil reconocer múltiples situaciones de la vida cotidiana, tanto laboral como lúdica, en que el sistema muscular está expuesto a sobrecargas creándose las condiciones ideales para la aparición del SDM. También son causa de aparición los traumatismos directos e indirectos, patologías de la columna vertebral y la disminución de las capacidades físicas básicas⁷ además, se ha descrito que los PGM pueden estar asociados o ser consecuencia de patologías metabólicas, viscerales, endocrinas, infecciosas o de origen psicológico^{2,8}.

Resulta relevante, en el contexto de salud basado en la evidencia, disponer de criterios que describan cuantitativamente la presencia de PGM y a la vez reforzar el sistema de evaluación de los tratamientos^{9,10}. A lo largo de las últimas dos décadas, numerosos trabajos de investigación han utilizado herramientas de electrodiagnóstico y diagnóstico por la imagen, con el objetivo de establecer unos criterios sólidos que permitan reconocer, tratar y evaluar la evolución de los signos y síntomas de los puntos gatillo en el SDM¹⁰⁻¹⁵.

1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LOS PGM: HIPÓTESIS INTEGRADA.

La hipótesis integrada fue desarrollada por David G. Simons y ampliada posteriormente por otros autores^{3,16}. En la actualidad, es la más estudiada y aceptada entre los expertos en la materia y engloba un conjunto de evidencias para explicar una serie de eventos encadenados entre sí. Seguidamente se presenta en forma resumida y en los siguientes apartados se llevará a cabo un análisis de los trabajos que aportan evidencia sobre algunos de los puntos que la componen y que serán estudiados en esta tesis.

Esta hipótesis propone que el fenómeno se inicia con una anómala liberación espontánea de acetilcolina (ACh) desde varias sinapsis neuromusculares (SNMs), elevando el potencial de membrana de forma muy localizada, en algunos miocitos. Este cambio de polaridad no alcanza los valores suficientes para desencadenar un potencial de acción, pero es suficiente para que algunos de los receptores de ACh, se activen y permitan la entrada de sodio en el citoplasma subsináptico. Este sodio activa el sistema sarcotubular cercano al terminal y permite la salida de calcio que tiene almacenado. Este calcio desencadena el mecanismo de contracción de los sarcómeros próximos al contacto sináptico. Estos sarcómeros mantendrán la contracción mientras haya calcio y energía disponibles. Esta contracción sostenida se mantendrá activada debido a la liberación espontánea alterada que seguirá liberando ACh en el terminal, durante un periodo de tiempo mayor a lo normal, provocando que en las fibras afectadas se formen los nódulos contracturados. El conjunto de estos nódulos de contracción son los PGM.

A partir de este punto, se desencadenan una serie de mecanismos fisiopatológicos. Estos nódulos de contracción sostenida provocarán demandas de oxígeno más elevadas pero que, sin embargo, comprimen los capilares sanguíneos adyacentes provocando una disminución de la irrigación de la zona que queda en hipoxia. Al mismo tiempo, se producirá un consumo de ATP (Adenosina trifosfato) mayor, para mantener la contracción, así como de los sistemas adyacentes dependientes de ATP, entre ellas: las bombas sodio potasio (bomba Na^+/K^+) para recuperar el potencial de membrana y las bombas de calcio del sistema sarcotubular. Este consumo mantenido puede suponer el agotamiento de ATP, lo que obliga al reclutamiento de otras vías metabólicas que generan catabolitos que se acumulan en la zona y se liberan al medio extracelular. Esta liberación de sustancias^{17,18} y la hipoxia supone un sufrimiento tisular, capaz de activar nociceptores locales, que generan dolor. Además, parte de estas sustancias liberadas en el área, son capaces de activar / irritar el sistema nervioso autónomo, que favorecerá la liberación anómala de ACh, creando un ciclo de perpetuación de neurotransmisión alterada^{3,19}.

1.4. SINAPSIS NEUROMUSCULAR.

En los siguientes apartados se presentará de forma resumida conceptos relacionados con la anatomía y fisiología del sistema musculo esquelético.

En el tejido muscular, el sistema nervioso se ramifica y distribuye para llegar a todas las fibras. La SNM es el punto de contacto entre el axón motor y la fibra muscular²⁰. Todas las fibras musculares presentes en un músculo reciben la inervación de un grupo de motoneuronas, que trabajan conjuntamente

En la SNM se distinguen dos partes: el componente presináptico y el postsináptico, Ambos componentes están separados por unos 50nm, este espacio recibe el nombre de hendidura sináptica. En esta hendidura, es donde se libera la ACh, desde el terminal nervioso y a través de ella circula hasta unirse con los receptores nicotínicos (AChRs) situados en la membrana postsinápticadelmiocito^{21,22}. En esta hendidura también se encuentra la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que hidroliza la ACh liberada en la hendidura, permitiendo que se cierren los canales de sodio y así finalizar el proceso de neurotransmisión, para a continuación, prepararse para el siguiente evento de exocitosis de ACh.

1.4.1. Componente presináptico.

El componente presináptico está constituido por el axón y la célula de Schwann. En el interior del terminal nervioso más cercano a la fibra muscular, se pueden identificar diversos orgánulos y un gran número de vesículas sinápticas que contienen la acetilcolina^{21,22}. Cabe destacar la presencia de muchas mitocondrias, ya que es necesaria una gran cantidad energía para poder sintetizar y liberar el neurotransmisor. La mayoría de las vesículas sinápticas se encuentran agrupadas en unas áreas densas de la membrana, conocidas como zonas activas, dado que es el lugar donde se libera la ACh.

1.4.2. Componente postsináptico.

El componente postsináptico es la parte de la membrana de la fibra muscular especializada en recibir el contacto sináptico. Esta parte de la membrana del miocito se presenta como una especialización, que consiste en unas dilataciones poco profundas, conocidos como pliegues sinápticos. Estos pliegues, incrementan la superficie disponible de la membrana postsináptica para la disposición de los receptores AChRs, comentados previamente.

1.4.3. Neurotransmisión en la unión neuromuscular.

El proceso de neurotransmisión evocada se inicia en la motoneurona, cuando ésta genera un potencial de acción en el soma, que recorre el axón hasta llegar a las SNMs que inerva. Tanto en el axón como en el miocito, el potencial de acción consiste en un cambio de

voltaje transitorio, debido al movimiento iónico entre el interior y exterior de las membranas celulares, regulado por canales distribuidos en la membrana. Cada uno tiene especificidad por un ion concreto. En estado de reposo, el axón mantiene su interior negativo, con una concentración intracelular predominante de K^+ y un extracelular rico en Na^+ que genera un potencial eléctrico de reposo de aproximadamente -80 mV. Cuando se inicia el potencial de acción se inicia el movimiento iónico, primero a favor del ion Na^+ , que entra hasta crear un predominio de cargas positivas intracelulares o fase de despolarización. Seguidamente, se produce su cierre progresivo y se abren los canales de K^+ , que salen hasta dejar de nuevo el interior negativo (fase de repolarización). El cierre retardado del canal de K^+ da lugar a una hiperpolarización o período refractario, que impide que la zona se vuelva a despolarizar²³. La presencia de la bomba de Na^+ / K^+ en la membrana, extrae el Na^+ e internaliza el K^+ , reequilibrando las cargas negativas en el compartimento intracelular y positivo en el extracelular. Cuando este potencial alcanza el terminal presináptico, de la SNM se abren los canales de calcio voltaje-dependientes, permitiendo la entrada de Ca^{2+} y estimulando la fusión de las vesículas de ACh, liberándola en la hendidura sináptica²⁴, para unirse a los receptores AChR postsinápticos, permitiendo así, la entrada de Na^+ en el interior del miocito e iniciando el potencial de acción, el cual se distribuye a lo largo de todas las fibras musculares a través del sistema sarcotubular, desencadenando la contracción muscular. La AChE, hidroliza el enlace entre la ACh permitiendo cerrar los AChR e iniciar el proceso de repolarización del terminal. La secuencia de eventos de neurotransmisión (liberación, unión a los receptores, hidrólisis y repolarización) dura unos pocos milisegundos²⁵.

Según la cantidad de ACh liberada en la SNM se puede distinguir dos tipos de neurotransmisión, la evocada y la espontánea, cada una de ellas genera diferente tipo de señal eléctrica que permite identificarlas y estudiarlas, mediante registros de electrofisiología intracelular (EI) y electromiografía (EMG). La neurotransmisión evocada, está asociada al movimiento voluntario y para ello, se produce una liberación elevada de ACh, que genera un cambio en el gradiente electroquímico suficiente para activar un potencial de acción que, a su vez, desencadena la contracción muscular. Este fenómeno se conoce como potencial de placa terminal del inglés, *end plate potential* (EPP).

En el caso de la neurotransmisión espontánea se produce una liberación de forma constante, aleatoria y de menor cantidad de ACh que en el EPP, por lo que, tan solo provoca una despolarización parcial de la membrana postsináptica. Por lo tanto, esta liberación no es suficiente para producir un potencial de acción, ni una contracción del miocito como en el caso previo. Este tipo de neurotransmisión, en los registros de EI se denomina “potencial de placa en miniatura” o MEEP del inglés *miniature end plate potential* y en la EMG se la denomina actividad eléctrica espontánea (AEE) o “ruido de placa” (RP) del inglés *end plate noise*. Hay evidencias suficientes que indican, que esta AEE, se deriva de los MEEPs procedentes de

varias sinapsis y se la relaciona con mantener el trofismo muscular en periodos de inactividad²⁶.

1.4.4. Actividad eléctrica espontánea y el registro electromiográfico.

Mediante la EMG se evalúa la integridad del nervio periférico, la SNM y el músculo. El estudio más habitual se centra en la capacidad de conducción de estímulos y reclutamiento voluntario muscular, que principalmente implica la neurotransmisión evocada²⁷.

Pero como se ha comentado en el apartado anterior, las fibras musculares en reposo presentan AEE. En este tipo de registro se distinguen dos tipos de señal, los MEEPs y las espigas. Durante la electromiografía, estos dos tipos de registros espontáneos se manifiestan de forma conjunta o independiente y se pueden registrar colocando un electrodo de registro, cerca de zonas con UNMs. Esta AEE se observa habitualmente en los músculos sanos, así como en los músculos denervados, aunque en este caso presenta un incremento^{27,28}.

Específicamente, los MEEPs, se registran como variaciones de la línea de base de unos 10-50 μV de amplitud y de entre 1 – 2 milisegundos (ms) de duración. Los electromiógrafos llevan acoplado un transductor electroacústico, que permite identificar algunas señales eléctricas durante los procedimientos de EMG, en este registro los expertos lo describen como un sonido, similar al de acercar al oído una caracola de mar²⁷.

El otro tipo de evento, las espigas, que en ocasiones coexisten con los MEEPs, consisten en potenciales de acción de una sola fibra muscular y se presentan como picos intermitentes de entre 100-200 μV de 3-4 ms de duración con una frecuencia de entre 5-50 Hz. Estas se registran como ondas bifásicas, de un tamaño mucho mayor a los MEEPs. Incluso en ocasiones aparecen ráfagas de este tipo de registro. Sin embargo, en este caso su origen no está tan claro. Se ha propuesto que se trata de una respuesta a un estímulo mecánico generado por la aproximación de la aguja de registro, a los terminales nerviosos²⁹. Por otro lado, el finlandés JuhaniPartanen³⁰ indica que en músculos con puntos gatillo miofasciales, las espigas pueden representar la activación de un arco de reflejo espinal y los potenciales de acción de este reflejo, pueden registrarse como trenes de espigas, sin embargo es necesario un estudio más exhaustivo. En resumen, en la actualidad existen varias hipótesis y aún está en debate el origen de estos registros, a falta de más trabajos que aporten datos más determinantes.

1.5. ANÁLISIS DE LAS EVIDENCIAS DE LOS MECANISMOS DESCRITOS EN LA HIPÓTESIS INTEGRADA.

1.5.1. Neurotransmisión espontánea incrementada.

El mecanismo inicial de la hipótesis integrada postula que, una liberación excesiva de ACh es el origen de los PGM. En trabajos anteriores^{31,32} demostraron que existe un mecanismo de retroalimentación positiva que aumenta la liberación de ACh por sí misma y también hay trabajos que relacionan¹⁶ el incremento de ACh en la SNM con una inactivación de la AChE debido a cambios en el pH^{33,34}. En otra línea de estudio, se describen algunas posibilidades que pueden conducir a esta situación por causa del uso excesivo de los músculos, trauma muscular, esguinces, distensiones o el estrés psicológico. En este sentido, el grupo de Qiang-Min Huang, en 2014, obtuvieron un modelo de PGM con liberación espontánea de ACh exacerbada en el músculo vasto lateral de rata, mediante la combinación de una contusión controlada, generada por un sistema mecánico y un protocolo de ejercicio^{35,36}. Posteriormente, este mismo grupo describieron nódulos de contracción subsinápticos en su modelo de PGM por lesión muscular confirmando la relación entre ambos³⁷.

En el caso del estrés psicológico, McNulty y colaboradores³⁸ analizaron electromiográficamente zonas con y sin PGM describiendo una mayor actividad eléctrica en las zonas con PGM durante la realización de actividades que requieran una mayor concentración, como un ejercicio aritmético, relacionando mecanismos emocionales con un posible incremento del dolor generado por un PGM. El estrés, conduce al incremento de ciertas hormonas y estimulación del sistema simpático, que, en algunos casos puede suponer un incremento de la liberación de ACh en la SNM contribuyendo a la generación y mantenimiento de PGM. Este incremento se puede registrar en el ruido de placa elevado en la zona de PGM. En este sentido en el trabajo de Chen y colaboradores³⁹ describieron una disminución del ruido de placa en conejos a los que se les había administrado fentolamina, estableciendo una relación entre el sistema nervioso autónomo y los PGM.

El hecho de soportar una sobrecarga muscular en actividades de la vida diaria, tales como levantar objetos pesados o actividades repetidas sostenidas por cuestiones laborales o lúdicas, puede suponer un incremento de la liberación espontánea de ACh¹⁶, como consecuencia de un daño de la membrana de los miocitos. En este sentido, Hidalgo y colaboradores evaluaron la presencia de hipersensibilidad mecánica en músculos de la cintura escapular y cuello con y sin dolor previo, en nadadores de élite. En sus resultados relacionaron la presencia de dolor e hipersensibilidad mecánica con la presencia de PGM activos⁴⁰.

Más recientemente, Blotnick y Anglister⁴¹, describieron que el ejercicio incrementa la formación AChE, para hidrolizar ACh en las SNMs de fibras de contracción rápida entrenadas.

Por lo tanto, parece razonable que una situación de baja condición física, junto con un incremento sostenido de la neurotransmisión evocada por diferentes mecanismos, puede aumentar la presencia de ACh en la hendidura sináptica, siendo un posible mecanismo desencadenante de la aparición de PGM.

1.5.2. Electromiografía en los PGM.

Tal y como se ha comentado, mediante la EMG se puede registrar la AEE o RP, de la zona de contactos sinápticos de los músculos.

Weeks y Travell en 1957⁴² fueron los pioneros en utilizar la electromiografía en el diagnóstico de los PGM. Concretamente describieron que los PGM del músculo trapecio en reposo, presentaban una serie de descargas de alta frecuencia, en forma de espiga mientras que, en áreas adyacentes al mismo músculo, había zonas que eran eléctricamente silentes. Esta actividad electromiográfica fue estudiada de nuevo en 1993, por Hubbard y Bercoff,⁴³ los cuales registraron una actividad similar a la de Weeks y Travell. Aunque en este trabajo, plantearon una hipótesis diferente: que el origen de esta actividad eléctrica tuviese el origen en husos musculares anormales, rechazando la hipótesis sobre el origen en las SNM extrafusales. Posteriormente a este trabajo, Simons y Hong⁴⁴, con el objetivo ampliar los trabajos anteriores, emplearon una amplificación y velocidad de lectura mayor en los registros electromiográficos, consiguiendo distinguir los dos tipos de registro característico de la AEE: las espigas y los MEEPs. En este punto descubrieron que este hallazgo, presentaba muchas similitudes, con los registros de potenciales de placa motora, descritos como registros normales²⁷ por los neurofisiólogos, cuando se realizan procedimientos de EMG. Llegados a este punto, los autores se centraron en describir las diferencias entre la AEE normal y anormal, la necesidad de ajustar los parámetros de lectura del electromiógrafo para registrarla y la importancia de adaptar la técnica de inserción y movimiento de la aguja de registro en el interior del tejido muscular, dado el tamaño microscópico de los contactos sinápticos y la especificidad de la AEE.

En una publicación más reciente se analizaron diferentes trabajos que aportaron nuevos argumentos a favor del origen en SNMs del ruido de placa⁴⁵. Uno de estos trabajos trato de diferenciar entre las fibras intrafusales, inervadas por motoneuronas alfa y entre las extrafusales, inervadas por motoneuronas gamma, administrando toxina botulínica. Sin embargo, ambos tipos al ser colinérgicas (utilizan la ACh como neurotransmisor), la inyección de toxina botulínica, bloqueante de este tipo de neurotransmisión, disminuyó el ruido de placa en ambas⁴⁶. En conclusión, no pudieron diferenciar si el origen del ruido, proviene de las fibras inervadas por motoneuronas alfa o gamma.

En otro trabajo describieron que los patrones de activación estáticos y dinámicos de las motoneuronas gamma, que contribuyen al control del movimiento, no afectan a la fuerza

de contracción voluntaria⁴⁷. Para evidenciar estas premisas se analizaron registros electromiográficos intramusculares y de superficie, de los comportamientos motores, de una zona con PGM y de una zona sin PGM. Para ello se eligió el trapecio superior, observando que los registros intramusculares y de superficie de la zona con PGM y sin PGM, durante una contracción muscular voluntaria, presentan similitudes entre ellos, correlacionando la amplitud electromiográfica y la fuerza de la contracción muscular, permitiendo establecer que el ruido de placa contribuye a la fuerza generada durante la contracción muscular. Este comportamiento electromiográfico es indicativo, que el origen de la AEE, es en las fibras extrafusales⁴⁸.

Sin embargo, a pesar de los argumentos aportados por parte de la comunidad científica que han estudiado este fenómeno¹, los neurofisiólogos no suelen utilizar la AEE como signo clínico en las evaluaciones de los pacientes con dolor causado por PGM, sino como un indicativo de la presencia de SNM²⁷. Aun así, en un trabajo más reciente se ha estudiado la relación entre los PGM y el ruido de placa y observaron que, en los músculos con PGM el ruido de placa era más fácil de localizar⁴⁹.

En conclusión, es posible el uso del registro electromiográfico, de la actividad eléctrica espontánea, de los músculos que presentan PGM, para evaluar el efecto de su tratamiento y proporcionar un diagnóstico cuantitativo del síndrome de dolor miofascial. Aunque es necesario, ampliar y mejorar el conocimiento de este tipo de registro y relacionarlo con la fisiopatología de los PGM para mejorar su aplicabilidad en el uso clínico.

1.5.3. Nódulos de contracción.

Según, la hipótesis integrada de Simons y confirmada por más autores^{19,50}, los PGM, son nódulos de contracción formados por sarcómeros subsinápticos contraídos debido a la liberación anómala de ACh en la SNM. Sin embargo, las evidencias sobre la existencia de un nódulo de contracción subsináptico son escasas.

Históricamente, la primera imagen se obtuvo en el músculo *gracillis* de perro en 1976⁵¹. Se trata de una imagen de microscopio óptico, donde no se observan con claridad, los sarcómeros contracturados que conforman los nódulos. En 1996 Reitinger y colaboradores⁵² realizaron una biopsia de nódulos palpables en el glúteo medio de cadáveres frescos, describiendo la presencia de un mayor diámetro en las fibras del nódulo respecto a las adyacentes. Además, las muestras analizadas con microscopio electrónico presentaron claros indicios de acortamiento en la banda I respecto la A, asociando este hecho a la presencia de un nódulo de contracción. Más recientemente, los grupos de Ballyns y colaboradores⁵³ y de Turo y colaboradores⁵⁴ utilizando la técnica de sonoelastografía estudiaron pacientes con signos y síntomas causados por PGM. En el trabajo de Ballyns describieron que es posible distinguir entre zonas con PGM activos o latentes, a parte, identificaron cambios en el sistema

microvascular cercano a los PGM, respecto a zonas sanas en el mismo musculo. En el trabajo de Turo, describieron que las zonas con PGM presentan una textura más homogénea y una rigidez más heterogénea, en comparación con zonas sanas. Sin embargo, esta forma de ecografía no llega al extremo de poder visualizar los nódulos de contracción subsinápticos de forma individualizada. Aun así, Turo y colaboradores pronostican que, con mayor refinamiento, puede ser una herramienta prometedora en el estudio de las patologías del tejido blando, puesto que permite combinar, la visualización ecográfica junto con el análisis del flujo capilar o la rigidez del tejido para identificar zonas con posible afectación por PGM.

En las décadas de los 70 y 80 se evaluaron los efectos de fármacos anticolinesterásicos, utilizados en el tratamiento de la *miastenia gravis* sobre la SNM. Se obtuvieron imágenes de microscopia electrónica de nódulos de contracción subsinápticos⁵⁵⁻⁵⁸. El principal objetivo de estos tratamientos anti-AChE, es aumentar la presencia de ACh en la hendidura sináptica, retrasándose su degradación, potenciando su acción sobre las SNM. Esas imágenes son compatibles con las de PGM.

En las investigaciones sobre las aplicaciones terapéuticas de estos fármacos en humanos, se observó que la anti-AChE, tiene unos efectos notables en la morfología y fisiología de la SNM. En este sentido Ariens y colaboradores⁵⁹ demostraron que las aplicaciones sistémicas de inhibidores de la AChE causan necrosis del componente postsináptico de la SNM debido a una sobreestimulación del aparato contráctil. Trabajos posteriores, relacionados entre sí, permitieron observar que las dosis terapéuticas producían cambios en el componente postsináptico y en la alineación del aparato contráctil próximo al mismo, presentando nódulos de contracción subsinápticos⁵⁵. Además, estos cambios histológicos se relacionaron con un incremento de la frecuencia de liberación de vesículas de ACh, registrada mediante electrofisiología intracelular y EMG⁵⁶. Posteriormente, David Simons y colaboradores⁵⁹ se apoyaron en algunos de estos trabajos, para tratar de encontrar explicación molecular a la fisiopatología de los PGM y para argumentar parte de la hipótesis integrada y, además, sirvieron de base teórica y metodológica para tratar de desarrollar un modelo animal con PGM⁶⁰, como veremos en un siguiente apartado.

1.6. RESPUESTA DE ESPASMO LOCAL.

El reflejo de espasmo local (REL) es una contracción repentina y localizada que se produce cuando se inserta la aguja o cuando se estimula manualmente de forma adecuada una o varias fibras musculares con PGM⁶¹⁻⁶³. Inicialmente la respuesta de espasmo local se consideró un signo como patognomónico de PGM¹ además, su aparición durante el tratamiento se relacionó con obtener una mayor eficacia⁶⁴. De hecho, la REL, ha sido objeto de estudio e interés en el ámbito científico y clínico, con el fin de establecerlo como referencia en la eficacia de los tratamientos de los PGM. Así, existen abundantes trabajos en los que se

evalúa si el tratamiento de los PGM con punción seca (PS) es más efectivo si se obtiene un REL durante el procedimiento o no^{9,65-67}.

Rha y colaboradores en 2011 publicaron el primer trabajo⁶⁸ que estudió ecográficamente los REL, provocados durante los tratamientos de punción seca en pacientes, para identificarlos y cuantificarlos. Estos autores observaron que el grupo en el que se produjeron las REL experimentó una mayor reducción del dolor en comparación con el grupo que no lo hizo. Recientemente, Koppenhaver y colaboradores⁶⁹, evaluaron la relación entre la REL, el dolor y la funcionalidad en la musculatura lumbar inferior. Para ello, inicialmente, los pacientes contestaron cuestionarios específicos, sobre el funcionamiento de la musculatura multifida lumbar y, posteriormente se midió la presión algométrica tolerada antes y después del tratamiento con punción seca. Se concluyó, que los pacientes que experimentaron REL mostraron una mejoría mayor, respecto de los pacientes que no la presentaron. Sin embargo, estas mejoras no afectaron los valores del dolor. Según Koppenhaver y colaboradores, la presencia de REL durante la punción puede ser relevante, sin embargo, no consideran que sea imprescindible para un tratamiento exitoso. En un trabajo más actual, Aitor Martin y colaboradores⁷⁰ estudiaron la influencia del dolor post punción seca en pacientes con PGM. Estos autores observaron un incremento del dolor post punción en los pacientes que experimentaron REL y plantearon la importancia de estudiar la relación entre la presencia del dolor postpunción y la adherencia al tratamiento además de la limitación en la realización de las actividades de la vida diaria. A diferencia de otros trabajos⁷¹, en los que si observaron un efecto analgésico junto con un incremento de la tolerancia la presión, en el trabajo de Aitor Martin y colaboradores⁷⁰ registraron un descenso en la tolerancia a la presión en la zona tratada.

A la vista de los datos actuales, queda patente que son necesarios más trabajos que clarifiquen la importancia y necesidad de que aparezcan REL en el tratamiento de PGM. Sin embargo, en el desarrollo de un modelo animal con PGM, la presencia de la REL en músculos pequeños, como los de los animales de laboratorio puede ser complicada, pero determinante, como un elemento más para tener en cuenta en la caracterización del PGM.

1.7. MODELOS ANIMALES DE PGM.

A lo largo de los apartados previos ha quedado evidenciado el gran interés científico y clínico que han generado los PGM en su papel como generadores de disfunción y dolor musculoesquelético. En la segunda mitad del siglo XX, se produjo un incremento notable de los trabajos dirigidos a dilucidar el tema. Especialmente David Simons y Chang Z. Hong que, junto a otros autores, desarrollaron una serie de trabajos en conejos^{44,72,73} con el objetivo principal de ampliar y describir las características electrofisiológicas e histológicas de los PGM

⁴³.

Concretamente en 1995, Hong y Torigoe⁷⁴ demostraron que el conejo constituía un modelo experimental adecuado para el estudio de la respuesta de espasmo local (REL) característica de los PG humanos. Los autores identificaron mediante palpación una banda tensa, que, al ser estimulada súbitamente, en un punto concreto, generaba un espasmo. A continuación, registraron mediante electromiografía un ruido de placa elevado, focalizado en ese punto y que disminuía a medida que alejaban la aguja de registro. Estos hallazgos permitieron profundizar en la identificación de la REL como signo clínico, durante la exploración de los músculos con PGM, así como signo de referencia sobre la efectividad del tratamiento. Por otro lado, también en 1995, Simons y colaboradores, hallaron evidencias en experimentos con este modelo, que la actividad eléctrica observada por Hubbard y Berkoff⁴³, provenía de fibras extrafusales. Estos estudios en conejos, junto con un estudio en humanos⁷⁵, implicaron firmemente a una zona de placas motoras disfuncional como principal localización de la fisiopatología de los PG, sentando las bases sobre las que posteriormente se desarrollaría la hipótesis integrada.

Ya en el siglo XX, desde el punto de vista molecular, Sigfrid Mense y David Simons⁶⁰ aumentaron experimentalmente la ACh en la hendidura sináptica mediante un fármaco anticolinesterásico que al mismo tiempo es un fluorocromo (*diisopropylfluorophosphate*, DFP) y que permitió visualizar las SNMs de la fibra muscular correspondiente por microscopia. Como se ha comentado anteriormente, los efectos de los anticolinesterásicos sobre en la estructura y función de la SNM, ya habían sido descritos^{55,56,59}, sin embargo Mense y colaboradores en esta ocasión, no lograron crear nódulos contracturados en los músculos tratados. En un intento de ampliar el trabajo y a la vez describir un posible factor generador de PGM, sobre impusieron actividad eléctrica en la zona tratada con DFP. Así se pretendía aumentar la cantidad de ACh en la hendidura sináptica a la par que se simulaba una situación de estrés mecánico, similar a la que se puede dar en la vida cotidiana, en una situación laboral o lúdica. Pero el resultado de sumar el fármaco y la electroestimulación acabó provocando lesión muscular incompatible con un modelo muscular útil para el estudio de los PGM. A pesar de este resultado, mostraron que el incremento de ACh en la hendidura sináptica podía ser una causa de la aparición de nódulos contracturados responsables del SDM.

Otro ejemplo de un modelo animal con características histológicas y electrofisiológicas propias de los PGM, lo encontramos en una serie de trabajos que toman los traumatismos repetidos como origen y mecanismo de activación de PGM. En este modelo utilizaron ratas a las que se les aplicó un protocolo de contusión controlada, seguido de un protocolo de ejercicio. A continuación evaluaron la presencia de bandas tensas y mediante registros electromiográficos hallaron ruido de placa (RP) alterado^{35,36}. En otros trabajos evaluaron los cambios histológicos posteriores al protocolo, observando la presencia de fibras de diferentes tamaños que presentaban nódulos contracturados⁷⁶. Además correlacionaron estos cambios

con las UNMs³⁷, estableciendo así la relación entre la presencia de RP alterado y nódulos contracturados, confirmando la relación entre la UNM y el PG.

1.8. TRATAMIENTO DEL SDM.

El SDM, requiere de una anamnesis extensa que permita al profesional sanitario identificar y planificar un tratamiento que puede llegar a ser multidisciplinar incluyendo un abordaje farmacológico⁷, nutricional⁷⁷, psicológico⁷⁸ y tratamientos no farmacológicos⁷⁹.

1.8.1. Tratamientos no farmacológicos del SDM.

En este grupo se hallan los tratamientos más extendidos entre la comunidad de profesionales que atienden a los pacientes con problemas musculares causados por PGM. Estas técnicas han presentado evidencias suficientes, en cuanto a la resolución de los signos y síntomas relacionados con los PGM y del SDM en general. En una línea conservadora, hallamos los tratamientos no invasivos, que engloban el masaje, la terapia manual, los estiramientos y protocolos combinados de estos, junto con ejercicios físicos específicos para reeducar la musculatura de la zona afectada, mejorando las estrategias de control motor del individuo y tratar de resolver sus dolencias o como mínimo disminuir la intensidad de los signos y síntomas⁸⁰⁻⁸². Instrumentalmente también se han usado y estudiado las técnicas laser, diferentes tipos de microondas y las ondas de choque⁸³⁻⁸⁵.

Por otro lado, se encuentra el abordaje invasivo mediante el uso de una aguja sólida. En este grupo hay dos grandes familias terapéuticas: las que usan únicamente la aguja sólida para crear una lesión tisular controlada en la zona con PGM es decir la punción seca (PS) y las que usan la aguja para introducir algún tipo de electricidad. Dentro de la modalidad de PS, existen dos subtipos, la punción superficial y la punción profunda con entrada y salida rápida. Este tipo de abordaje es actualmente el más extendido y conocido por los terapeutas que tratan el SDM desde hace más de dos décadas⁸⁶. Actualmente se sabe que el uso de la PS ofrece resultados similares al tratamiento farmacológico pero sin sus efectos secundarios^{87,88}. Incluso llega a disminuir el dolor post intervención en prótesis de rodilla, disminuyendo así el uso de fármacos analgésicos⁸⁹.

1.8.2. Corriente Galvánica Intramuscular en el tratamiento de los PGM.

Dentro del abanico de tratamientos no farmacológicos, también se ha extendido el uso de las corrientes eléctricas en diferentes modalidades, entre las que encontramos: la estimulación nerviosa transcutánea (*transcutaneous nerve stimulation*, TENS); la estimulación eléctrica muscular (EMS, *electrical muscle stimulation*) generalmente aplicada a través de la piel en puntos concretos, con el objetivo de activar la contracción muscular; la electroacupuntura (EA) que combina la inserción de agujas en puntos de acupuntura junto

con la estimulación eléctrica. También, en la última década se ha extendido otra modalidad, la Corriente Galvánica Intramuscular (CGI), técnica también conocida entre los profesionales de la salud como electrolisis percutánea musculoesquelética (EPM) o electrolisis percutánea intratisular (EPI). La aplicación percutánea o intratisular de la corriente galvánica, fue desarrollada inicialmente, a finales de los 70, para tratar algunos tipos de tumores⁹⁰⁻⁹⁴, y ha sido adaptada para tratar tendinopatías^{95,96}. En los últimos 5 años, se ha ampliado para tratar el SDM⁹⁷. Esta técnica, consiste en administrar corriente galvánica o continua, a través de una aguja que se inserta en el tejido a tratar. Este tipo de corriente, consiste en un flujo eléctrico unidireccional, que tradicionalmente se ha usado en fisioterapia, aplicada mediante electrodos de superficie, con diferentes objetivos como la rehabilitación en lesiones nerviosas, el tratamiento de úlceras de decúbito y en la administración de fármacos transdérmicos⁹⁸.

Un aspecto que hay que tener en cuenta, es que el desarrollo y evolución de la técnica de CGI, está estrechamente ligado a los avances de la ecografía en el sistema muscular esquelético, permitiendo visualizar la aguja durante su inserción en el tejido objetivo, aplicando con seguridad y precisión el tratamiento^{99,100}.

Los mecanismos de acción de las corrientes eléctricas en líneas generales involucran la excitabilidad de los tejidos musculares y nerviosos^{93,94} para generar estímulos que permitan activar mecanismos fisiológicos celulares. En el caso concreto de las corrientes TENS, abordan el dolor mediante la activación antidrómica de una red neuronal compleja^{101,102}. Este estímulo eléctrico aferente se transmite por el sistema nervioso hasta activar sistemas inhibitorios descendentes que disminuyen la hiperalgesia. En el caso de la EA, también es utilizada para tratar el dolor y los efectos descritos en la literatura científica¹⁰³, involucran numerosos mecanismos celulares como posibles responsables de sus efectos. La EMS también ha sido estudiada de forma amplia^{104,105} en las últimas décadas y su mecanismo de acción se basa en activar la contracción muscular artificialmente. Con esta activación se consigue desencadenar numerosas reacciones intracelulares, tanto en el tejido muscular como en el tejido nervioso con el que interactúa.

Por lo que respecta a los mecanismos descritos en la literatura científica con la técnica de CGI, existen artículos interesantes relacionados con la activación de cascadas de señalización intracelular que favorecen el control de la reacción inflamatoria, tanto en patologías tendinosas⁹⁹ como en musculares¹⁰⁶. Sin embargo, faltan trabajos que describan con mayor detalle los efectos fisiológicos generados por el tratamiento de los PGM. Por otro lado, los efectos fisiológicos generados con la inserción de una aguja en el músculo esquelético, han sido principalmente descritos para la acupuntura, técnica que consiste en insertar agujas en puntos concretos del cuerpo^{107,108}, además en un trabajo publicado por nuestro equipo de investigación¹⁰⁹, anterior al desarrollo de esta tesis, se describieron los procesos fisiológicos de inflamación y regeneración del tejido, que desencadena la punción

seca intramuscular. En ese trabajo se aplicaron 15 inserciones intramusculares en el músculo *levator auris longus* (LAL) de ratones para, a continuación, extraer los músculos tratados a las 3 y 24 horas y al tercero, quinto y séptimo día, no observándose perturbaciones en el proceso inflamatorio ni en la regeneración muscular y nerviosa, mediante técnicas de histología, inmunohistoquímica y microscopio electrónico.

En resumen, el creciente interés de la comunidad científica y profesional en la técnica de CGI ha motivado varios trabajos^{100,110,111} para disponer de información que permita explicar los resultados observados en la práctica clínica y al mismo tiempo mejorar la seguridad y efectividad del tratamiento. Sin embargo, aún sigue habiendo puntos por esclarecer que requieren ser estudiados.

1.8.3. Características de aplicación de la CGI.

Uno de los puntos fuertes de la CGI es el uso de la ecografía para monitorizar todo el proceso de tratamiento, identificando estructuras tisulares que deben ser evitadas como arterias, venas y nervios, direccionando la aguja de forma precisa hacia zonas diana del sistema muscular esquelético.

Aun así, la corriente galvánica por sí misma puede llegar a ser lesiva. En cirugía de tumores se usa la CG, para generar una “ablación electrolítica” que aprovecha un importante incremento de temperatura, junto con reacciones electroquímicas, para realizar resecciones quirúrgicas de tejido tumoral, para ello se emplean dosis de corriente con un gran amperaje y duración¹¹²⁻¹¹⁵. Sin embargo, los objetivos y las características de estos tratamientos están muy alejados de los usados en fisioterapia. Los protocolos actuales de CGI en fisioterapia^{95,96,116} emplean bajos amperajes y corta duración, por lo que, son considerados atérmicos. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido confirmada por ningún trabajo previo y el incremento de temperatura local concentrado en una aguja de pequeño calibre, como es el caso de la CGI, podría poner en riesgo la integridad del tejido tratado. En esta tesis se evalúa este aspecto.

Por otro lado, en los últimos años, el diseño y construcción de las agujas han mejorado notablemente. Sin embargo, aún no hay ningún estudio que las evalúe en el caso de la CG aplicada al tejido muscular. En este sentido hay que tener en cuenta el fenómeno de electrolisis generado por el uso de corriente continua en tejidos biológicos. Este fenómeno consiste en la separación de moléculas por medio de la electricidad. Una de las principales reacciones producidas en el tejido muscular, es la descomposición del agua: $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$. Además, si la intensidad y duración de la corriente aplicada son suficientes se generan más reacciones, tanto en los tejidos como en los electrodos que administran la corriente⁹⁴. Por este motivo hay que considerar la posibilidad que los elementos que componen las agujas

utilizadas durante los tratamientos de CGI puedan sufrir cambios cuando se aplica la corriente galvánica^{94,117}.

En algunas técnicas similares, como en la EA, modalidad de acupuntura a la que se conectan electrodos para aplicar corriente, la alteración de esas agujas durante su uso ya ha sido motivo de estudio. Hwang y colaboradores¹¹⁸ describieron una gran corrosión de las agujas utilizadas durante la aplicación de esta modalidad de tratamiento generando, además, una acumulación de compuestos metálicos en el tejido tratado. Eso implica que el uso de la corriente galvánica, durante un tiempo suficiente, en determinadas áreas, podría dejar indeseables residuos metálicos, con consecuencias indeseables. Además, la posible pérdida o cambios de los materiales de las agujas pueden disminuir su diámetro, aumentando así la resistencia al paso de la corriente eléctrica y por tanto generar cambios térmicos. En esta tesis también se evalúan las agujas usadas en la CGI, para descartar estos aspectos adversos comentados.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS GENERAL.

Las corrientes galvánicas aplicadas intramuscularmente, revierten eficazmente los puntos gatillo miofasciales en un modelo animal y además es un tratamiento seguro sin efectos indeseables.

2.2. OBJETIVOS GENERALES.

El principal objetivo de esta tesis doctoral es el desarrollo de un modelo animal con puntos gatillo que presente características electrofisiológicas, histológicas y ecográficas, descritas en la literatura científica y que permita evaluar el efecto de diferentes tratamientos utilizados habitualmente en la práctica clínica. En concreto:

1. Buscar un anticolinesterásico que aumente la liberación espontánea de ACh de forma importante y sostenida capaz de generar nódulos de contracción subsinápticos y perdurables una semana.
2. Evaluar varias formas de corrientes galvánicas habitualmente usadas como tratamiento del SDM para revertir los signos electrofisiológicos de PGM.
3. Analizar la seguridad de la aplicación de corriente galvánica intramuscular, en los aspectos de: alteración morfológica y de composición de las agujas durante su uso; cambios de temperatura; cambios en el pH.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. ANIMALES Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.

En este apartado se presentan los materiales y métodos del artículo 1, Experimental myofascial trigger point creation in rodents, estos son comunes, con características particulares, en los 3 artículos que se presentan en esta tesis. Las características particulares se detallarán en los apartados específicos 4.2 y 4.3.

Para la realización de los experimentos con animales, se ha dispuesto de la autorización del Comité Ético de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira y Virgili de Reus. El cuidado y manipulación de los animales se ha realizado contemplando las directrices establecidas en las guías del Consejo Directivo de la Comunidad Europea del 24 noviembre de 1986 (86 / 609EC) y al Real Decreto del Gobierno Español 53/2013 para el tratamiento humano de los animales de laboratorio. Los animales de experimentación utilizados en este trabajo han sido ratones Swiss jóvenes adultos machos (45 y 50 días edad) y ratas Sprague-Dawley machos (60-70 días edad). Han sido suministrados por la empresa Charles River (Barcelona, España). Los animales se han mantenido en el estabulario en jaulas estándar de Makrolon® (27x27x14 cm³ para ratones y 23x46x14 cm³ para ratas). La temperatura ambiental se ha mantenido constante a 20-22°C con y una humedad relativa del 60-70% controlados con un termostato electrónico. Los ciclos de luz artificial han sido de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. La alimentación e hidratación de los animales adultos fue *ad libitum*, a base de pienso de mantenimiento para rata y ratón del tipo VRF-1 suministrado por la firma comercial Charles River y agua clorada *ad libitum*. Los animales para los experimentos de electrofisiología intracelular e histología han sido anestesiados con la administración intraperitoneal de tribromoetanol al 2% (TBE 0.15 ml por cada 10 g de peso del animal). Una vez anestesiados se comprobó la abolición de los reflejos y se han desangrado para proceder a la extracción del modelo muscular, como se detalla en el apartado de obtención y preparación de las muestras para los experimentos. Para los experimentos de electromiografía y ecografía, los animales se han anestesiado con el mismo procedimiento y tras comprobar la inexistencia de reflejos, se han llevado a cabo los procedimientos descritos.

3.2. ADMINISTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTICOLINESTERÁSICOS.

Los fármacos anticolinesterásicos (anti-AChE) se disolvieron en solución Ringer normal (composición: NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 12 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 1 mM) y se administraron mediante dos procedimientos *in vivo* y *ex vivo*. En el procedimiento *in vivo* con los animales anestesiados, se inyectó la dosis subcutáneamente en la zona toracolumbar, mediante una jeringa de 1ml con una aguja hipodérmica 0.3x13mm (BD Microlance™). La correcta administración del fármaco provoca la aparición de un síndrome colinérgico agudo que aparece a los pocos minutos posteriores y desaparece a los 30 minutos.

Este síndrome consiste en fasciculaciones musculares generalizadas en todo el cuerpo, que provocan un temblor generalizado, además, se produce aumento de secreción involuntaria de saliva, lágrimas y orina. En el procedimiento *ex vivo*, el fármaco se administra en la camarilla de registro utilizada para emplazar el músculo extraído y realizar registros intracelulares.

Los anti-AChE utilizados y evaluados para desarrollar el modelo animal con PGM han sido la Neostigmina (NTG (NTG 0.1mg PTG / kg peso del animal); la Piridostigmina (PTG 0.1mg PTG / kg del animal); la Rivastigmina (RTG; 0.1mg PTG / kg del animal) y Fasciculina II (FII; 350nM / kg del animal). Todos suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

3.3. MODELOS MUSCULARES.

Para el desarrollo de esta tesis se han utilizado los músculos *levator auris longus* (LAL), el diafragma y los gastrocnemios. El LAL y el diafragma se han utilizado para los experimentos de electrofisiología e histología. Por otro lado, los gastrocnemios se han utilizado para los experimentos con electromiografía y ecografía

El LAL y el diafragma precisan extracción y disección en una placa de Petri recubierta de Sylgard. Se ha utilizado material quirúrgico, agujas entomológicas y una lupa para realizar la disección. Para mantener el músculo en buenas condiciones fisiológicas, la disección se realiza con el tejido sumergido en solución Ringer (composición: NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 12 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 1 mM y glucosa 11 mM, pH 7.3) continuamente oxigenado con 95% de O₂ y un 5% de CO₂. En la figura 1 se muestran cronológicamente los experimentos realizados para desarrollar el modelo animal con PGM, después de administrar el anti-AChE.

3.4. REGISTRO INTRACELULAR.

3.4.1. Equipo de registro intracelular.

El equipo de electrofisiología está formado por un microscopio, un micromanipulador, amplificador, tabla digitalizadora y un sistema de registro informático (Axoscope 10.2, San Diego, USA; ver figura 2). Se usan como electrodos de registro capilares de borosilicato (diámetro interno de 0.86 mm, diámetro externo 1.5 mm; GC150 F-10, Harvard Apparatus Ltd. UK), que mediante un estirador de pipetas (P-97 Sutter Instruments Novato, USA) se calientan y estiran hasta obtener una punta de menos de 1 µm de diámetro y una resistencia entre 20-40 MΩ. Este electrodo se llena con KCl 3 mM (CIK 3 M). Para obtener los registros, el electrodo de registro se introduce en el citoplasma de los miocitos del músculo diseccionado. Por otra parte, se utiliza como electrodo de referencia un filamento de plata clorurada Ag-AgCl conectado a distancia de la zona de emplazamiento del músculo, mediante un puente de Agar (Agar 3,5% en 137mM NaCl) sumergido en Ringer normal.

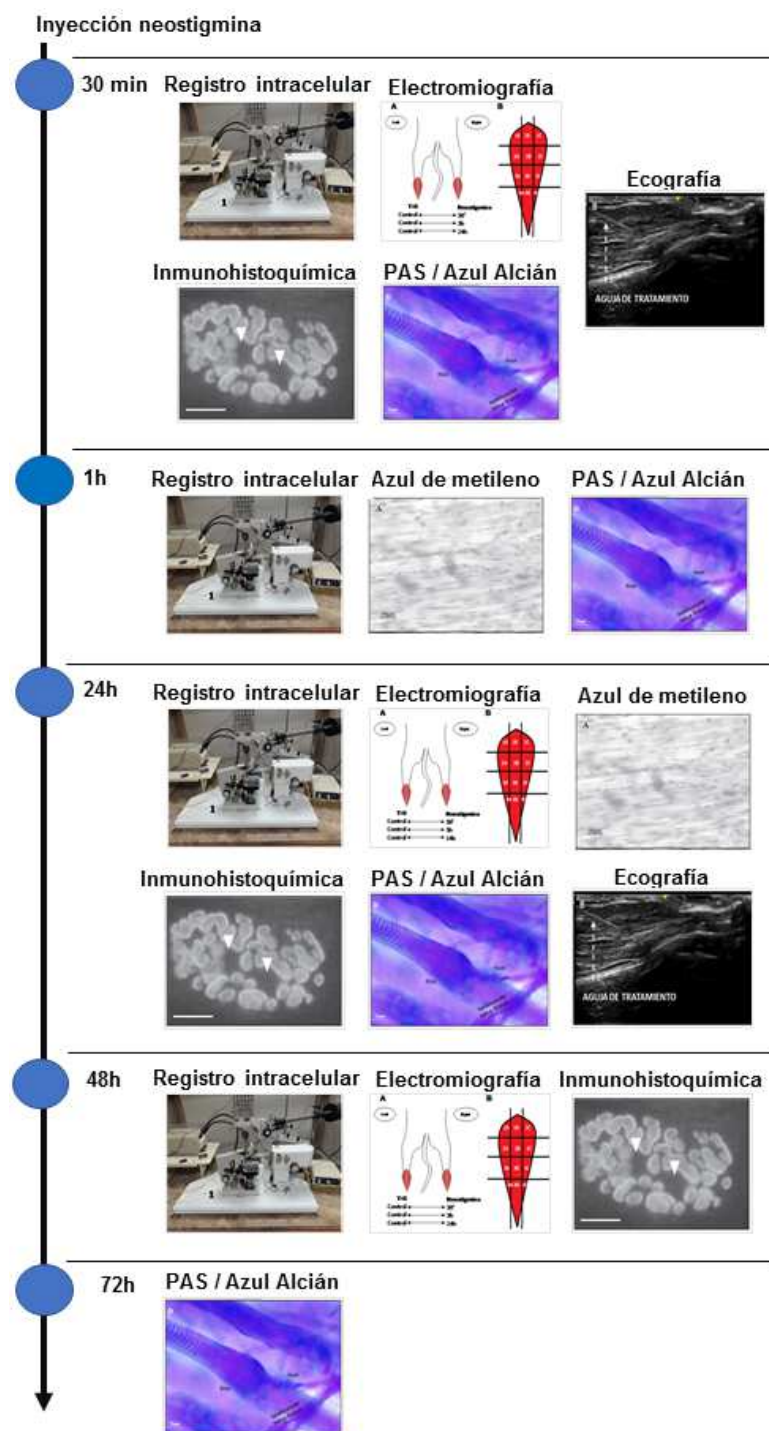


Fig. 1. Línea cronológica de las técnicas utilizadas sucesivamente para el desarrollo del modelo animal con PGM. En imágenes se muestran las técnicas y su realización posterior a la administración del anti-AChE.

Ambos electrodos se conectan a un amplificador diferencial (Tektronics, AMS02, Tektronix, Inc., Beaverton, OR, US) con el fin de amplificar la señal 10 veces. Los registros

se digitalizan (DIGIDATA 1322A, Interface, Axon Instrument Inc. Weatherford, TX, USA) y a continuación se almacenan y analizan con el programa informático Axoscope 10.2 (Axon Instruments, San Diego, USA). Todo el conjunto de registro electrofisiológico es montado encima de una mesa antivibratoria y situado dentro de una jaula de Faraday, construida con material conductor que bloquea las interferencias eléctricas externas. La habitación donde está emplazado el equipo de registro intracelular tiene controlada la temperatura a 26° y la humedad al 50%.

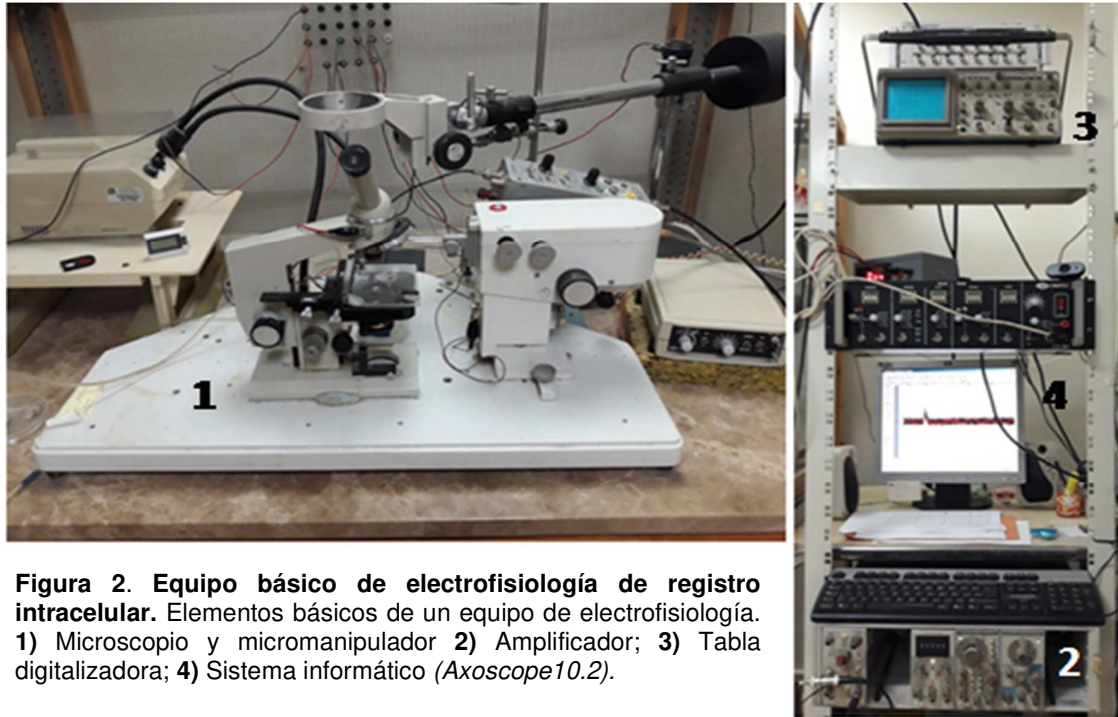


Figura 2. Equipo básico de electrofisiología de registro intracelular. Elementos básicos de un equipo de electrofisiología. 1) Microscopio y micromanipulador 2) Amplificador; 3) Tabla digitalizadora; 4) Sistema informático (Axoscope10.2).

3.4.2. Procedimiento para el registro intracelular y procesamiento de los datos.

Los experimentos electrofisiológicos se han llevado a cabo con el músculo LAL y diafragma. En el proceso de disección de ambos músculos es necesario preservar la máxima integridad del tejido muscular retirando el máximo tejido conectivo, graso y muscular adyacente que los rodea, para poder llevar a cabo registros más cómodamente. Seguidamente se coloca la muestra en una cámara de registro (1.5ml de volumen) y se mantiene vivo realizando recambios del Ringer oxigenado cada 30 minutos, durante el tiempo que dura el experimento.

En los experimentos en que se administra el anti-AChE *in toto* se usó un Ringer con una baja concentración de fármaco para disminuir el lavado del fármaco por el recambio del Ringer (0.01mg / kg).

Una vez emplazado el músculo se lleva a cabo la inserción del electrodo de registro en una fibra muscular. Se confirma una adecuada inserción cuando el potencial de membrana

es superior a -50mv. Posteriormente se verifica la presencia de MEEPs y si estos presentan un tiempo de subida menor a 1 ms (lapso entre la base y el pico de un MEEP) se procede a grabar los MEEPs que aparecen durante 60 segundos. El registro se rechaza si durante la grabación el potencial de membrana cae más de 5mV.

3.4.3. Experimentos con tratamiento *ex vivo* e *in vitro*.

Los experimentos *in vitro* son aquellos en que se extrae el músculo de interés, se instala en la cámara de registro, realizando lavados con Ringer oxigenado, cada 30 minutos. Manteniendo el músculo en la cámara de registro, se realizan 15 registros en fibras diferentes, cerca de las SNMs (registros control). Seguidamente se realiza una incubación con un anti-AChE durante una hora. Una vez finalizada la incubación se realizan 15 registros de otras SNMS (registros experimento). Una vez analizados los registros, se realiza un estudio comparativo entre los registros control respecto a los registros experimento. La principal ventaja de este tipo de experimentos es que se puede asegurar la cantidad de anti-AChE que está recibiendo la muestra. Por el contrario, el tejido no se encuentra en las condiciones fisiológicas del organismo, por lo que no recibe su irrigación normal (faltan de oligoelementos, vitaminas, hormonas etc. de los que el Ringer adolece).

Los experimentos *in vivo* son aquellos en que el tratamiento se lleva a cabo antes de la extracción de la muestra, inyectándolo al animal vivo de forma subcutánea. Cuando el síndrome colinérgico ha desaparecido (30 min) se procede a la disección y montaje en la cámara de registro para realizar al menos 15 registros en fibras musculares diferentes (registros experimento). Al igual que en la exposición *in vitro*, se realizan cambios de Ringer para mantener la muestra viva, con el anti-AChE en dilución. En el grupo control se realizaron registros sin exposición a ningún anti-AChE. Una vez analizados los registros, se realizó un estudio comparativo entre los registros control respecto a los registros experimento. La principal ventaja de esta modalidad es que la administración del fármaco se realiza en condiciones fisiológicas normales para el músculo, es decir sin alterar la irrigación sanguínea ni del aporte de nutrientes. Pero, por el contrario, no se puede acreditar la cantidad de fármaco que recibe el músculo.

3.4.4. Parámetros electrofisiológicos estudiados.

Los parámetros estudiados en los MEEPs registrados son: la frecuencia de aparición (número de eventos por minuto); la amplitud del evento que se considera desde la línea de base hasta el punto más alto del evento, expresado en milivoltios (mV); el tiempo de caída (*half decay time*) el tiempo que tarda el MEPP desde el punto más álgido al llegar a la mitad de la amplitud. Modificaciones en la frecuencia da información sobre acción axonal de los compuestos químicos. Alteraciones en la amplitud es indicativo que los compuestos químicos tienen una acción sobre el componente postsináptico. El *half decay time* aporta información sobre el efecto de los anti-AChE que se evidencia como un alargamiento de este tiempo de caída (ver figura 3). Se realizaron registros de al menos 15 uniones neuromusculares diferentes y se promediaron los valores. La amplitud media (mV) por fibra se calculó y se corrigió por sumaación no lineal¹¹⁹asumiendoun potencial de membrana ideal de -80 mV.

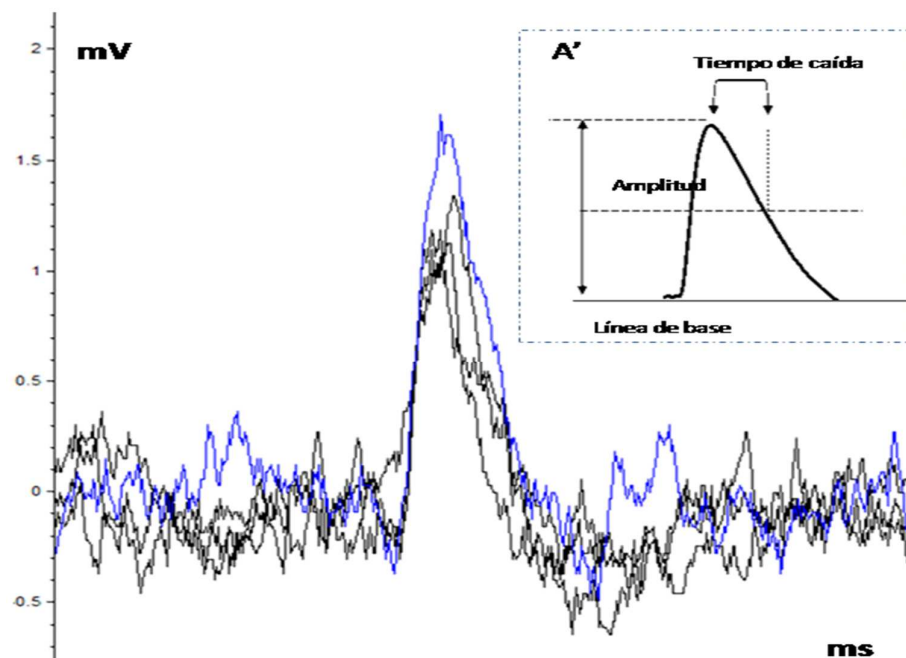


Figura 3. Ejemplo de registro de los potenciales de placa miniatura (MEEPs). Imagen real del registro en que se han superpuesto varios eventos. **A'.** Parámetros evaluados en los MEPPs. **Amplitud del evento**, se registra desde la línea de base hasta el punto más alto, expresado en milivoltios (mV); **el tiempo de caída**, el tiempo que tarda el potencial de membrana al llegar a la mitad de la amplitud

3.5. REGISTRO ELECTROMIOGRAFICO

3.5.1. Procedimiento.

Los registros de ruido de placa se obtuvieron con un sistema de electromiografía (Medelec Mystro plus, GR20) con una aguja de EMG concéntrica (Natus Manufacturing Limited) con la siguiente configuración: 50 μ V de amplificación y 100 milisegundos por división. El animal anestesiado es colocado en decúbito prono con las extremidades estiradas. La habitación se mantiene a una temperatura de 22^o-25.8^oC. Ya que el procedimiento no conlleva un sacrificio del animal, se le coloca una vía intraperitoneal para mantenerlo anestesiado y vivo durante el procedimiento. El procedimiento de registro consiste colocar un electrodo de referencia superficial en la base de la cola del animal. Seguidamente, se rasura la zona posterior de las extremidades inferiores y se realiza una incisión para cortar la piel que recubre el paquete muscular del área de los gastrocnemios, exponiéndolo y permitiendo un acceso directo.

El primer registro EMG se realiza en el gastrocnemio derecho (registro control, Figura 4.A). Seguidamente se inyecta la neostigmina subcutáneamente y se comprueba que aparezca el síndrome colinérgico. Pasados 30 minutos, 3h y 24h se procede al registro de la pata izquierda (registro experimento, Figura 4. A). En cada pata se estudia el número de áreas que presentan ruido de placa y la frecuencia de eventos expresado en Hertzios en cada una de ellas. Con el fin de no repetir ni omitir ninguna zona, se sigue un orden sistemático de las áreas, numeradas por números (filas) y letras (columnas), iniciando el procedimiento de registro desde el extremo distal al proximal, empezando por la zona 4A, seguida de 4C y luego 4B (ver Figura 4.B). El proceso se repite con cada número y letra. En cada área se debe insertar una la aguja concéntrica, lentamente y sin realizar movimientos bruscos y una vez emplazada se realizan pequeños giros, dentro de cada una de las doce áreas descritas previamente, para localizar alguna señal registrable. Se considera que una zona tiene ruido de placa cuando éste aparece y se mantiene durante 5 segundos.

3.5.2 Parámetros electromiográficos estudiados.

En los registros de EMG, se obtienen dos tipos de señal: las provenientes del ruido de placa y las espigas (Fig. 5). Solo el ruido de placa es finalmente analizado debido a que la relación de las espigas no está del todo definida con a los PGM.

3.6. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.

3.6.1. Azul de metileno.

Técnica de histología clásica que permite observar la posible reacción inflamatoria presente en el tejido. Muy útil en la fase inicial del proyecto, durante el periodo de testeo de dosis de anti-AChE, para discriminar si se provoca reacción inflamatoria y digestión enzimática del aparato contráctil. La técnica se ha llevado a cabo inmediatamente la disección sumergiendo las muestras en 2% de azul de metileno (Sigma Aldrich) disuelto en agua bidestilada durante 10 minutos. Seguidamente se realizan tres lavados con agua destilada, durante dos minutos cada uno. Finalmente se han deshidratado las muestras sumergiéndolas en alcoholes al: 30%, 50%, 70%, 90% y al 100% (Panreac) y se han montado con resina epoxi en un portaobjetos (Thermo scientific Mezel-Gläser) y un cubreobjetos (Hischmann Laborgenate).

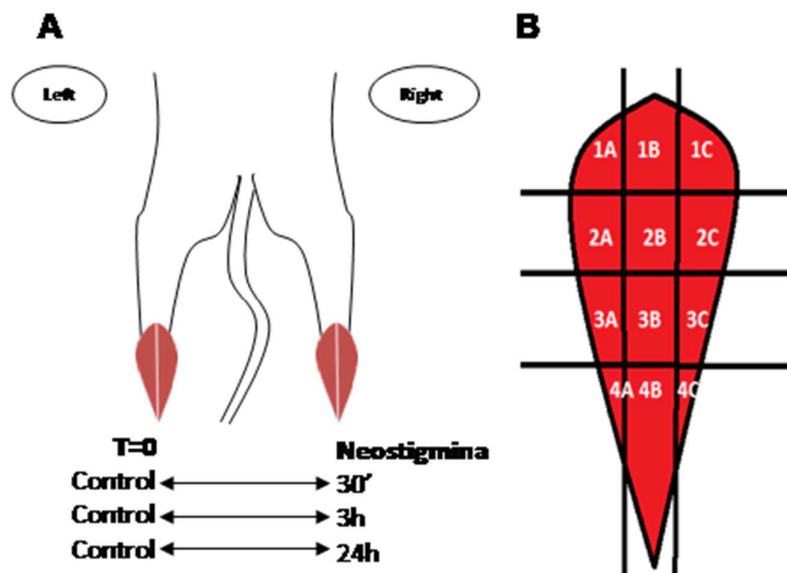


Figura 4. Procedimiento de EMG. A. Esquema del emplazamiento del animal en decúbito prono y patas posteriores depiladas. **B.** División de los gastrocnemios en 12 áreas virtuales para el registro.

3.6.2. Tinción PAS-Alcián

Es una técnica combinada de histoquímica que permite la detección y tinción de mucopolisacáridos neutros y ácidos mediante la combinación del ácido periódico de Schiff (PAS) y azul Alcián. El azul Alcián es un colorante básico utilizado para la localización de polisacáridos como por ejemplo los glucosaminoglicanos en los cartílagos. El PAS permite la tinción de polisacáridos, glucógeno, glicolípidos y glicoproteínas neutras. Su unión selectiva se debe a la reacción entre el reactivo ácido periódico, que transforma los glicoles en grupos

aldehído, el reactivo de Schiff reacciona con estos grupos proporcionando un color rosa o magenta.

La tinción se ha llevado a cabo, con una modificación del protocolo clásico que consiste en no utilizar fijadores en la muestra. De esta forma se preserva la membrana celular y solo se tiñen los glucosaminoglicanos extracelulares. La técnica se ha realizado directamente en la placa de Petri recubierta de Sylgard con los músculos estirados mediante agujas entomológicas. Se inicia con azul Alcian 8GX (Sigma Aldrich) y ácido acético al 3% durante 15 minutos. A continuación, se realiza un lavado con agua destilada y se oxidan en ácido periódico durante 15 minutos. Seguidamente se sumerge la muestra en el reactivo de Schiff de Coleman (Sigma Aldrich) durante diez minutos. Finalmente se realiza un lavado de 3 minutos y se sumergen en metabisulfito ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) al 10%. Finalmente, se realiza una deshidratación (alcoholes al: 30%, 50%, 70%, 90% y al 100%) para el montaje usamos, el portaobjetos y cubreobjetos con resina epoxi.

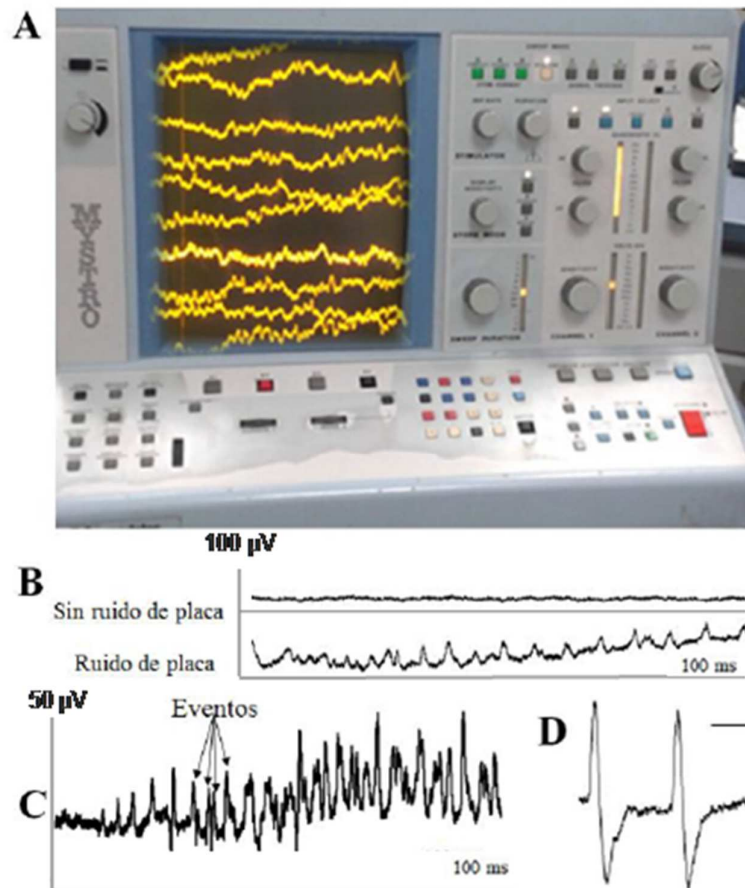


Figura 5 Electromiografía. A. Electromiógrafo que se ha utilizado en esta tesis para hacer los registros. B. Ejemplo de 2 registros electromiográficos, uno en un área sin ruido de placa (arriba) y otro en un área con ruido de placa. C. Registro muy amplificado ($50\mu\text{v}$) que permite evidenciar como se ha procedido para contabilizar los eventos del ruido de placa y así establecer la frecuencia. Barra vertical: 1mV. Barra horizontal: 2.5 ms.

3.6.3. Marcaje fluorescente de los receptores AChR.

Esta técnica permite llevar a cabo estudios morfológicos, de los receptores de ACh presentes en el componente postsináptico de la membrana del miocito. Consiste en la utilización de la α -bungarotoxina rodaminada, para detectar los AChR de los músculos tratados. Después de diseccionar los músculos siguiendo el procedimiento descrito, se fijaron con paraformaldehído al 4% (pH 7.4) durante 45 minutos. Seguidamente, se permeabilizan las membranas con Tritón X-100 al 1% y bloquean las reacciones inespecíficas con BSA al 4% disuelto en tampón fosfato salino (*Phosphate Bovine Serum*, PBS, ajustado a pH 7.4; KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, NaCl 140 mM y Na_2HPO_4 8.1 mM) a 4°C durante una noche. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con agitación y a temperatura ambiente, seguidamente, se incubó la alfa bungarotoxina (α -BTX) conjugada con tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC, Molecular Probes) dilución 1:800, esta se une irreversiblemente a los nAChRs del componente postsináptico y permite detectar las zonas de inervación. Tras la incubación, se han hecho tres lavados de 10 minutos con tampón PBS, con agitación y a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de anticuerpo. Los lavados se han realizado en la oscuridad para evitar la pérdida de intensidad de fluorescencia. Por último, se montaron las muestras con Mowiol (4-88, Calbiochem) para prolongar la marca fluorescente. Las muestras se han dejado reposar 24 horas, para luego ser visualizadas.

La visualización de la muestra se ha llevado a cabo mediante un microscopio láser de confocal (TE 2000-E Nikon) y el estudio morfométrico con el programa NIS-Elements (NIS-Elements AR 3.00 NIKON, Japón). El programa permite delimitar el perímetro del receptor postsináptico de la SNM, obteniendo un valor para realizar posteriormente un estudio de la frecuencia de los tamaños.

3.7. ESTUDIO ECOGRÁFICO.

En esta técnica se han utilizado los músculos gastrocnemios de rata Sprague-Dawley macho (60-70 días edad). La rata, por su mayor tamaño, permite una mejor exploración manual y observación ecográfica que con el ratón.

Este estudio se realiza a temperatura ambiente, de 22°-25.8°C para mantener las constantes del animal estables. Este procedimiento no conlleva el sacrificio del animal, por lo tanto, se coloca una vía intraperitoneal para mantener el estado de anestesia durante el procedimiento.

Inicialmente, en la pata izquierda se realizó el procedimiento de exploración manual, inserción de la aguja y aplicación de la técnica de punción seca (ver figura 6.A). Posteriormente, se administró NTG subcutáneamente y 30 minutos después, se aplicó el mismo protocolo y procedimientos, en este caso en la pierna derecha. Todos los procedimientos se monitorizaron continuamente con el ecógrafo LOGIQ E R7 (General

Electric) y una sonda L10-22-RS (General Electric). Las agujas utilizadas durante los procedimientos son agujas solidas (0.30x40 Physio Invasiva) y fueron de fácil identificación como se puede ver en la figura 6.B)



Fig. 6. Estudio ecográfico para identificar los signos clínicos de los PGM. A. La rata se sitúa boca abajo anestesiada, se inserta la aguja y se monitoriza con el ecógrafo. **B.** Captura de pantalla del ecógrafo durante el tratamiento, la flecha señala la señal hipocóica de la aguja de PS en el interior del paquete muscular.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los datos obtenidos se procesaron mediante el programa Microsoft Excel, almacenadas y posteriormente se realizó el estudio estadístico con el programa SPSS para Windows. Los valores se expresan como medias \pm SEM. Algunas veces los valores se expresan como "Porcentaje de cambio". Esto se define como: [valor experimental / valor de control] X 100. Utilizamos la prueba t de Welch de dos colas para valores no apareados porque nuestras variaciones no eran iguales. Se optó por esta prueba porque es más restrictiva que la prueba t ordinaria. Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0.05$.

4. RESULTADOS


**4.1. ARTICULO 1 EXPERIMENTAL MYOFASCIAL TRIGGER POINT
CREATION IN RODENTS.**

4.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ARTÍCULO 1. EXPERIMENTAL MYOFASCIAL TRIGGER POINT CREATION IN RODENTS.

1. Buscar entre los fármacos anti-AChE disponibles, el más idóneo para generar PGM.
2. Analizar la neurotransmisión espontánea y evaluar el efecto de los anti-AChE propuestos mediante técnicas de registro intracelular *in toto* y *ex vivo*, en un músculo tónico (diafragma) y en otro de fásico (*levator auris longus, LAL*).
3. Evaluar la aplicación *in toto* del AChE elegido, en una sola dosis y en dosis repetidas para generar un modelo animal que presente signos electrofisiológicos e histológicos descritos en la literatura durante una semana.
4. Estudiar electromiográficamente el ruido de placa en músculos sanos y evaluar los cambios durante la administración de anti-AChE.
5. Evaluar mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas los cambios estructurales en las sinapsis neuromusculares y la posible presencia de glucosaminoglicanos en los músculos de animales tratados con anti-AChE.
6. Estudiar ecográficamente la presencia de signos clínicos de los PGM: la banda tensa y la respuesta de espasmo local.

RESEARCH ARTICLE

Experimental myofascial trigger point creation in rodents

Ramon Margalef,¹ Marc Sisquella,¹ Marc Bosque,¹ Clara Romeu,¹ Orlando Mayoral,² Sonia Monterde,³ Mercedes Priego,¹ Rafael Guerra-Perez,⁴ Nicolau Ortiz,⁵ Josep Tomàs,¹ and  Manel M. Santafe¹

¹Unit of Histology and Neurobiology, Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University, Reus, Spain; ²Physical Therapy Unit, Hospital Provincial de Toledo, Toledo, Spain; ³Unit of Physiotherapy, Department of Medicine and Surgery, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University, Centre Tecnològic de Nutrició i Salut Avinguda Universitat, Reus, Spain; ⁴RG Clinic, Madrid, Spain; and ⁵Neurology Section, Department of Medicine, Sant Joan University Hospital, Reus, Spain

Submitted 19 March 2018; accepted in final form 3 October 2018

Margalef R, Sisquella M, Bosque M, Romeu C, Mayoral O, Monterde S, Priego M, Guerra-Perez R, Ortiz N, Tomàs J, Santafe MM. Experimental myofascial trigger point creation in rodents. *J Appl Physiol* 126: 160–169, 2019. First published October 11, 2018; doi:10.1152/jappphysiol.00248.2018.—Myofascial pain syndrome is one of the most common forms of muscle pain. In this syndrome, pain is originated by the so-called trigger points, which consists of a set of palpable contraction knots in the muscle. It has been proposed that a high, spontaneous neurotransmission may be involved in the generation of these contraction knots. To confirm this hypothesis, we exposed mouse muscles to an anticholinesterasic agent to increase the neurotransmission in the synaptic cleft in two different conditions, in vivo and ex vivo experiments. Using intracellular recordings, a sharp increase in the spontaneous neurotransmission in the levator auris longus muscle and a lower increase in the diaphragm muscle could be seen. Likewise, electromyography recordings reveal an elevated endplate noise in gastrocnemius muscle of treated animals. These changes are associated with structural changes such as abundant neuromuscular contracted zones observed by rhodaminated α -bungarotoxin and the presence of abundant glycosaminoglycans around the contraction knots, as shown by Alcian PAS staining. In a second set of experiments, we aimed at demonstrating that the increases in the neurotransmission reproduced most of the clinical signs associated to a trigger point. We exposed rats to the anticholinesterase agent neostigmine, and 30 min afterward we observed the presence of palpable taut bands, the echocardiographic presence of contraction knots, and local twitch responses upon needle stimulation. In summary, we demonstrated that increased neurotransmission induced trigger points in both rats and mice, as evidenced by glycosaminoglycans around the contraction zones as a novel hallmark of this pathology.

NEW & NOTEWORTHY In rodents, when neostigmine was injected subcutaneously, the neuromuscular neurotransmission increased, and several changes can be observed: an elevated endplate noise compared with normal endplate noise, as evidenced by electromyographic recording; many muscular fibers with contraction knots (narrower sarcomeres and locally thickened muscle fiber) surrounded by infiltration of connective tissue like glycosaminoglycans molecules; and palpable taut bands and local twitch responses upon needle stimulation. Several of these signs are also observed in humans with muscle pain.

Address for reprint requests and other correspondence: M. M. Santafe, Unit of Histology and Neurobiology, Dept. of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University, Carrer St. Llorenç num 21, 43201-Reus, Spain (e-mail: manuel.santafe@urv.cat).

animal model; endplate noise; myofascial pain syndrome; myofascial trigger point; spontaneous acetylcholine release

INTRODUCTION

Myofascial pain syndrome (MPS) is one of the most frequent causes of muscular pain observed clinically (reviewed in Ref. 16). MPS is a collection of known sensory, motor, and autonomic symptoms caused by myofascial trigger points (MTrPs) (9, 29). An MTrP is an hyperirritable area in a skeletal muscle associated with a palpable and tender nodule located in a taut band of muscle. This taut band consists of a group of muscle fibers of increased consistency and with an abnormal state of tension. MPS is very common in humans, and it is estimated that almost everyone might suffer at least one episode during his life (16).

Electromyography (EMG) allows clinicians to confirm the existence of MTrPs. Electromyographically, MTrPs can be diagnosed by the finding of a characteristic recording called endplate noise, which corresponds to the spontaneous release of acetylcholine (ACh) in the motor endplates of some muscular fibers (8, 17). According to Hong and Simons (12), an MTrP is composed of multiple active loci from where this characteristic EMG recording can be obtained. Furthermore, the existence of elongated hypoechoic regions in the area of MTrPs can be revealed by ultrasound diagnosis (30). Currently, the most accepted theory on the pathophysiology of myofascial trigger point involves an altered or abnormal neurotransmitter release, and this starts a cascade of events ultimately forming a MTrPs (27). It has been experimentally demonstrated that a maintained increase (from 20 to 30 min) of ACh in the synaptic cleft generates a myocyte membrane potential with insufficient values to “trigger” an action potential but enough to allow an increase in Na^{2+} in the subsynaptic cytoplasm (15). This increase in sodium permeates the sarco-tubular system locally and depolarizes the system, which induces a progressive efflux of Ca^{2+} . This calcium will locally activate contraction. Finally, a disk of contraction is built in the subsynaptic area, which constitutes the palpable nodule previously discussed as myofascial trigger points. An integrated hypothesis proposes that shortening of sarcomeres in knot contractions causes a shortening of the muscle fiber causing tau band (27). On the other hand, Shah and colleagues (25, 26), using a sophisticated technique of microanalysis in patients,

demonstrated the existence of substances associated with pain and inflammation. Specifically an elevated concentration of protons, SP, calcitonin gene-related peptide, bradykinin, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, 5-HT and norepinephrine were found in an area of MTrPs located in the upper trapezius. Despite these few works, MPS pathophysiology has been poorly studied.

Simons and Stolov (28) performed a biopsy and obtained the first images of contraction knots from a palpable nodule located in a taut band in the gracilis muscle of dogs. Many years later, Mense et al. (21) obtained disks of contraction similar to those of MTrPs in the gastrocnemius muscle of the rat by means of an electrically induced contractile activity added to the treatment with the anticholinesterase agent DHP. Nevertheless, they also obtained undesirable muscle injuries that Simons and Stolov (28) had not described.

More recently, Shah and colleagues (25, 26), using a sophisticated technique of microanalysis in patients, demonstrated the existence of high concentrations of substances associated with pain and inflammation in an area of MTrPs. Despite these few works, the pathophysiology of MPS remains poorly studied.

We have generated multiple contraction knots clearly identified by microscopy and multiple active loci identified by electrophysiology techniques in mice. Myofascial trigger points were generated by increasing the ACh in the synaptic cleft by means of anticholinesterasic agents injected subcutaneously. This model reproduced the related signs of MTrPs described in the literature and would become an important tool to better understand the pathophysiology of MPS.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed on adult young male Swiss mice (45–50 days postnatal; $n = 139$) and Sprague-Dawley rats (60 to 70 days post-natal, $n = 18$; Charles River, L'Arbresle, France). Animals were euthanized by exsanguination under anesthesia. The animals were cared for in accordance with the guidelines of the European Community's Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the Spanish Royal Decree 53/2013 for the humane treatment of laboratory animals. This study was approved by the Ethics Committee of the Rovira i Virgili University.

Muscles

Animals were anesthetized with 2% tribromoethanol (0.15 ml/10 g body weight ip) and euthanized by exsanguination while deeply anesthetized. The levator auris longus (LAL; fast-twitch muscle) and diaphragm (slow-twitch muscle) with their nerve supply were excised and dissected on a Sylgard-coated Petri dish containing normal Ringer solution and continuously bubbled with 95% O₂-5% CO₂. Both the LAL and diaphragm were used for the electrophysiological study. The gastrocnemius muscles were used for electromyography and ultrasonographic recordings (Table 1).

Anticholinesterasic Exposure

Studies done by injecting drugs into the live animal (in toto) ensure a physiological environment in terms of oxygen, hormones, vitamin trace elements, and other supplies provided by the blood, but we do not know the exact dose of anticholinesterase that reaches every muscle. On the other hand, studies in the recording chamber (ex vivo) allow us to control the dose of exposure, but the physiological solution (Ringer) used, despite being a good saline solution, does not bring vitamins, hormones, or other ions in blood. Finally, to overcome these limitations, we decided to include both experimental approaches.

We increased ACh in the synaptic cleft in two different experimental conditions of exposure to anticholinesterasic agents: in vivo and ex vivo experiments. To choose the best drug and the most effective dose at inhibiting acetylcholinesterase, we tested several anticholinesterase agents: three classic drugs such as neostigmine methyl sulfate (NTG; 0.1 mg NTG/kg body wt; Sigma), pyridostigmine (PTG; 0.1 mg PTG/kg body wt; Sigma), and rivastigmine (RTG; 0.1mg RTG/kg body wt; and Fasciculin II (FII; 350 nM, Sigma), the last of which is the most recent generation of anticholinesterase.

For in vivo experiments, NTG, PTG, or RTG were injected subcutaneously (thoracolumbar area) into adult male Swiss mice. To ensure the correct drug administration, we expected the appearance of a cholinergic syndrome within 30 min posttreatment. Cholinergic syndrome is characterized by generalized tremor (clearly seen in the extremities), increased salivation, and tearing. If the cholinergic syndrome did not appear, the animal was discarded for the study. We have chosen a treatment with subcutaneous neostigmine (whole animal) rather than intramuscular treatment to prevent from the needle injuries that could interfere with the results.

The muscles were exposed to anticholinesterasic in ex vivo experiments for intracellular recordings exclusively (see below). The muscles were normally excised and dissected on a Sylgard-coated Petri dish containing normal Ringer solution that was continuously bubbled with 95% O₂-5% CO₂. Then, the anticholinesterasic (NTG or FII) was added to the bath for 60 min before the recording started.

Table 1. Methodological approach

Animal (Technique)	Muscle	Time After Neostigmine Treatment					
		30 min	1 h	3 h	24 h	48 h	72 h
Mouse							
Intracellular recordings	LAL/diaphragm	■	■	□	■	■	□
Methylene Blue	LAL	□	■	□	■	□	□
PAS/Alzian Blue	LAL	■	□	□	■	□	■
Histochemical	LAL	■	□	□	■	■	□
Electromyography	Gastrocnemius	■	□	■	■	□	□
Rat							
Intracellular recordings	LAL	■	□	□	□	□	□
PAS/Alzian Blue	LAL	■	□	□	□	□	□
Electromyography	Gastrocnemius	■	□	□	■	□	□
Ultrasound	Gastrocnemius	■	□	□	■	□	□

Several techniques were performed on the muscles shown at the indicated time periods after neostigmine exposure. ■, Technique performed; □, no technique performed.

Electrophysiology: Intracellular Recordings

Spontaneous miniature endplate potentials (mEPPs) were recorded intracellularly with conventional glass microelectrodes filled with 3 M KCl (20–40 MΩ resistance). Records were rejected if the membrane potential (Vm) was less than -50 mV or if it fell by >5 mV during the recording period.

The recording electrodes were connected to an amplifier (Tecktronics, AMS02). A distant Ag-AgCl electrode connected to the bath solution via an Agar bridge (Agar 3.5% in 137 mM NaCl) was used as reference. MEPPs were digitized (DIGIDATA 1200 Interface; Axon Instruments), stored, and analyzed by computer. We used Axoscope 10.2 (Axon Instruments) for data acquisition and analysis. The MEPP frequency was recorded for 100 s from ≥15 different neuromuscular junctions, and the values were averaged. The mean amplitude (mV) per fiber was calculated and corrected for nonlinear summation (19) assuming a membrane potential of -80 mV.

In ex vivo experiments, we proceeded as follows. First, we recorded mEPPs from ≥15 different control neuromuscular junctions. Then we incubated the muscle with the anticholinesterase (NTG or FII) for 1 h, and we recorded mEPPs from ≥15 different neuromuscular junctions.

For in vivo experiments, we proceeded as follows: NTG, PTG, or RTG was injected subcutaneously in adult male Swiss mice; when the acute cholinergic syndrome disappeared (30 min), the sample (LAL or diaphragm) was normally excised and dissected as explained above, and mEPPs were recorded from ≥15 different neuromuscular junctions.

Histological Techniques

Methylene blue. Whole LAL muscles were removed and exposed to a 1% methylene blue dissolved in 1% borax for 2 min. Subsequently, the samples were washed with distilled water for three steps of two minutes each. Finally, we proceeded to dehydration and mounting with epoxy resin.

Periodic acid Schiff/Alcian Blue staining. The samples were not fixed, and they were directly labeled. In this manner, the cellular membrane is quite preserved, and the extracellular glycosaminoglycans (GAGs) are better labeled. The LAL muscles were normally excised and dissected on a Sylgard-coated Petri-dish containing normal Ringer solution. The muscles maintained in the Sylgard-coated Petri-dish were directly labeled with Alcian Blue 8GX and 3% acetic acid for 15 min. Subsequently, the samples were washed with distilled water and oxidized in periodic acid for 2 min. Then the samples were placed in Coleman's Schiff's Reagent for 10 min. Later, the muscles were washed in water for 3 min and placed in 10% sodium metabisulfite. Initially, the samples were directly mounted in glycerin because the label colors can be seen better than when the samples are dehydrated. To preserve the samples for a long time, after the analyses we proceeded to dehydration and mounting with epoxy resin.

Immunohistochemical technique. Whole LAL muscles were removed and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 45 min at room temperature (~22°C). The LALs were labeled for postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors with tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)-α-BTX (1:800 dissolution; Molecular Probes). Muscles were mounted in Mowiol with p-phenylenediamine (Sigma). A morphometric study of the image was made to evaluate the area for each synaptic contact with the Nis Elements (Nikon). Finally, the frequency distribution analysis of the measured synaptic areas was performed.

Endplate Noise Recordings

The needle EMG (nEMG) records were always obtained from an anesthetized animal at a controlled room temperature between 22 and 25.8°C. The muscle used for this study was the gastrocnemius because it is easy to access and is suitable for the study. Results from

intracellular recording experiments determined that the neostigmine was the most effective anticholinesterase in terms of increasing the frequency of mEPPs. For this reason, endplate noise experiments were performed only with neostigmine.

Registers were obtained with an electromyography system (Medelec Mystro plus, GR20) with a monopolar EMG needle (Natus Manufacturing). The needle is slowly inserted into the muscle and, once inside, is moved to record in all directions. The muscle was divided into 12 areas (Fig. 1A) to cover all the muscle and to avoid registering the same endplate noise twice. The recording needle is introduced into the gastrocnemius until a change in the noise can be heard. Electromyography screen is then studied, and if it is correct (without alternating current, artifacts, etc.) endplate noise is recorded. The number of areas with endplate noise (≤12; see Fig. 1A) was recorded. During the time recording endplate noise, we count the number of potential per second that have appeared. That is the frequency and is expressed in Hz.

The experiments proceeded as follows: 1) a control nEMG recording in the left gastrocnemius, 2) subcutaneous injection of NTG, 3) the animal showing cholinergic syndrome, 4) nEMG examination of the right gastrocnemius muscle (see Fig. 1B).

Ultrasonography

Muscular ultrasonography was performed in rats with an ultrasound (LOGIQ E R7; General Electric) and a transducer (General

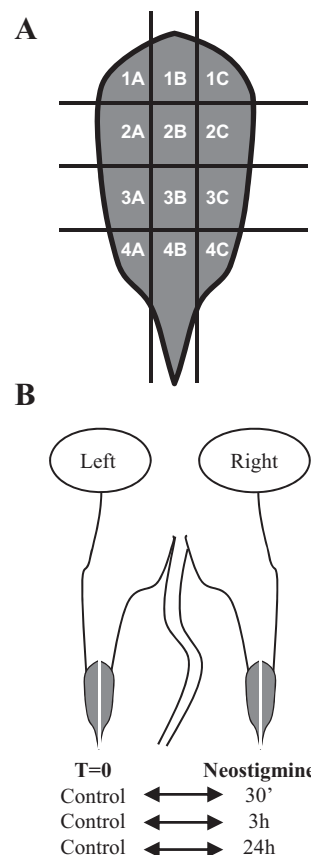


Fig. 1. Endplate noise. A: scheme of the gastrocnemius muscle showing the 12 virtual areas used for registration to ensure no repetitions or absences. B: scheme of the protocol used for recording the endplate noise. Before treatment, the left gastrocnemius was recorded. Then, the animal was treated with subcutaneous neostigmine, and 30 min, 3 h, or 24 h later the right gastrocnemius examination was performed. In all cases, to minimize interindividual variability, the values obtained in the right (exposed to neostigmine) and the left gastrocnemius (control) were compared.

Electric, L10-22-RS). Ultrasound needle within tissues is identified as a bright line that penetrates tissue or only as a reflection of the tip. If a sudden and very localized movement when the needle is inserted into the muscle is seen, it is considered to be a local twitch response. If the needle insertion shows only the tip deforming the tissue while penetrating, it is considered that the local twitch response has not occurred. First MTrPs and local twitch response to dry needling muscles were assessed in left gastrocnemius before treatment. Then, rats were treated with neostigmine, and 30 min later the right gastrocnemius muscles were palpated for MTrPs and dry needled during ultrasonographic monitoring. In both cases, the dry needling procedure was applied using a solid filament needle and with the multiple insertion technique usually employed to elicit local twitch responses in a muscle with MTrPs.

Lists of Chemicals and Equipment

Mice were supplied by Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Tribromoethanol and other salts were supplied by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Sylgard was supplied by Dow Corning. Anticholinesterase agents neostigmine (NTG), piridostigmine

(PTG), rivastigmine (RTG), and fasciculin II (FII) were supplied Sigma-Aldrich, stereoscopic magnifying glass (EMT) was from Meiji Techno (Tokyo, Japan), monopolar EMG needles were from Natus Manufacturing (Galway, Ireland), micromanipulator was from Prior (Cambridge, UK), Medelec Mystro was from Teca Medelec (London, UK), and ultrasound and transducer were from General Electric (Boston, MA).

Statistical Procedure

Values are expressed as means \pm SE. The values are expressed as "percentage of change." This is defined as [experimental value/control value] \times 100. We used the two-tailed Welch's *t*-test for unpaired values because our variances were not equal. We prefer this test because it is more conservative than the ordinary *t*-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Electrophysiology: Intracellular Recordings

To choose the best drug and the most effective dose at inhibiting acetylcholinesterase, we tested several anticholinesterase agents. Two muscles, the diaphragm as a slow-twitch muscle and LAL as a fast-twitch muscle, were also chosen (see Fig. 2A). To visualize the muscle fibers and localize the possible NMJ requires flat, thin, and transparent muscles. These muscles are very thin and easy to manipulate for electrophysiological studies.

The results obtained in the diaphragm were globally moderate compared with those obtained in the LAL muscle (Fig. 2B). The higher increase in the frequency of mEPPs was obtained when the diaphragm was exposed to neostigmine (NTG) in the recording chamber (ex vivo experiments; $\sim 200\%$ increase). Twenty-four hours after a single subcutaneous injection of NTG (0.1 mg NTG/kg body wt), no significant changes in frequency were produced (variation of experimental values with respect to control values: $2.88\% \pm 4.77$; $n = 45$

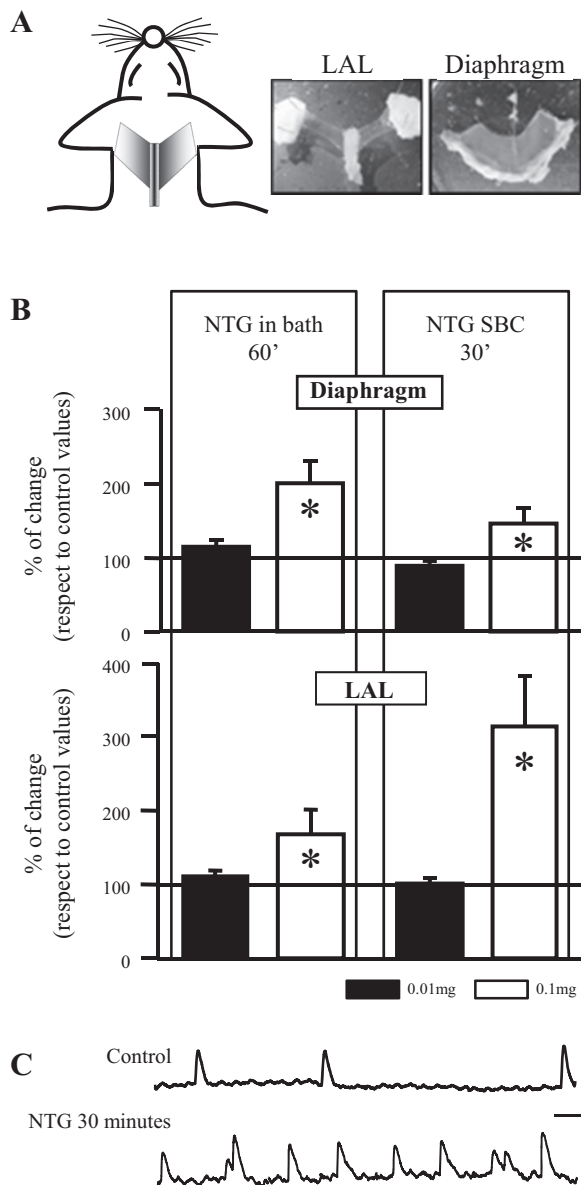


Fig. 2. Intracellular recordings [miniature endplate potentials (mEPPs)]. A: scheme of the anatomic location of levator auris longus (LAL) muscle (left). Photograph of the LAL muscle (middle) and right hemidiaphragm (right). Note that these muscles are almost transparent because they are extremely thin. B: histograms at left show the increases in mEPP frequency in ex vivo experiments; the samples were exposed to neostigmine (NTG) in a chamber of recording. Histograms at right show in vivo experiments; the muscles were exposed to NTG by subcutaneous injection (SBC) to the animal in toto. Two doses were used: 0.01 mg (black bars) and 0.1 mg (open bars) of NTG/kg body weight. Note that NTG (0.1 mg NTG/kg) is most effective for in toto experiments and in LAL muscles. * $P < 0.05$; hemidiaphragm ex vivo experiments: 0.1 mg of NTG, $P = 0.0068$, 62° of freedom, $n = 45$ synapses from 5 animals; hemidiaphragm ex vivo experiments: 0.01 mg of NTG, $P = 0.3034$, 117° of freedom, $n = 90$ synapses from 10 animals; hemidiaphragm in toto experiments: $n = 45$ synapses from 7 animals treated with 0.1 mg of NTG, $n = 45$ synapses from 6 control animals, $P = 0.0201$, 76° of freedom; hemidiaphragm in toto experiments: $n = 45$ synapses from 5 animals treated with 0.01 mg of NTG, $n = 45$ synapses from 6 control animals, $P = 0.3884$, 70° of freedom; LAL ex vivo experiments: 0.1 mg of NTG, $P = 0.0007$, 78° of freedom, $n = 45$ synapses from 5 animals; LAL ex vivo experiments: 0.01 mg of NTG, $P = 0.3826$, 132° of freedom, $n = 90$ synapses from 10 animals; LAL in toto experiments: $n = 36$ synapses from 6 animals treated with 0.1 mg of NTG, $n = 66$ synapses from 8 control animals, $P < 0.0001$, 100° of freedom; LAL in toto experiments: $n = 45$ synapses from 5 animals treated with 0.01 mg of NTG, $n = 45$ synapses from 6 control animals, $P = 0.9707$, 85° of freedom. C: examples of intracellular recordings from a control muscle (top) and a muscle exposed to NTG subcutaneously in toto (bottom); note the increased frequency of mEPPs. Vertical bar, 1 mV; horizontal bar, 25 ms.

synapses from 3 treated animals, $n = 45$ synapses from 6 control animals; $P = 0.6115$; 70° of freedom).

The highest increase in the frequency of mEPPs ($\sim 300\%$) was obtained in the LAL muscle 30 min after a subcutaneous injection of the NTG (0.1 mg NTG/kg body wt; see Fig. 2, B and C). In the ex vivo experiments, the frequency of mEPPs was also increased (Fig. 2B). Consistently with the results obtained from the diaphragm, when the LAL muscle was extracted 24 or 48 h after treatment (0.1 mg NTG/kg body wt, repeating every 12 h), the frequency of mEPPs did not change (%variation when the LAL muscle was extracted 24 h after treatment respect to control values: 2.88 ± 5.52 , $P = 0.6395$, 94° of freedom; $n = 66$ synapses from 7 control animals, $n = 45$ synapses from 3 treated muscles; %variation when the LAL muscle was extracted 48 h after treatment respect to control values: 15.48 ± 4.77 , $P = 0.1816$, 92° of freedom, $n = 66$ synapses from 7 control animals, $n = 36$ synapses from 3 treated muscles). On the other hand, after a single subcutaneous injection of NTG (0.1 mg NTG/kg body wt), the mEPPs frequency remained high only for the first day, whereas 48 h after the frequency, values of spontaneous events returned to normal values (%change: 16.80 ± 4.55 , $P = 0.6032$, 68° of freedom, $n = 30$ synapses from 2 treated muscles, $n = 66$ synapses from 7 control animals). It is important to note that a low dose of NTG (0.01 mg NTG/kg body weight, Fig. 2B, black bars) was completely ineffective in this regard.

Because NTG is a reversible anticholinesterasic drug ($k_i = 1.02$ mM) used for ~ 40 yr, we also tried the selective and irreversible inhibitor of the acetylcholinesterase fasciculin II (FII; 350 nM; $k_i = 0.33$ mM), which is more potent than NTG. Ex vivo experiments were performed in LAL muscle, and mEPP frequency did not change (%change: 11.42 ± 8.32 , $P = 0.5369$, 88° of freedom, $n = 45$ synapses from 3 muscles), but the mEPP amplitude was strongly increased (%change: 201.29 ± 10.96 ; $P = 0.0001$, 100° of freedom, $n = 45$ synapses from 3 muscles). These results showed that FII is an anticholinesterase agent that induced a lower increase in the frequency of mEPPs than NTG.

Moreover, some experiments were made in toto with pyridostigmine (PTG; 0.1 mg PTG/kg body wt). Pyridostigmine is an anticholinesterasic from the same family as NTG but had the lowest carbamylation rate of the studied substances. We found that pyridostigmine had no effect on the frequency of mEPPs (%change: 4.31 ± 0.70 , $P = 0.6758$, 44° of freedom, $n = 66$ synapses from 3 treated muscles, $n = 66$ synapses from 7 control animals). To study the contribution of a central effect of anticholinesterase drugs, we also performed some experiments with rivastigmine (RTG; 1 mg RTG/kg body wt). Rivastigmine is also an anticholinesterasic agent from the family of NTG that readily enters the central nervous system, but its effects on peripheral tissue or muscles are considered negligible. We observed that RTG had no effect on the frequency of mEPPs (0.1 mg RTG/kg body wt; %change: 21.38 ± 4.84 ; $P = 0.3748$, 89° of freedom, $n = 66$ synapses from 3 treated muscles, $n = 66$ synapses from 7 control animals).

In summary, the subcutaneous treatment with the anticholinesterasic neostigmine at a single dose of 0.1 mg/kg was the most effective in terms of increasing the frequency of mEPPs, and the optimal results were obtained in LAL muscle.

Morphological Study

Methylene blue. We were interested in a long-term effect of NTG; however, this drug is a reversible anticholinesterasic inhibitor. For this reason, we first planned experiments for repeated dosing every 12 h (0.1 mg NTG/kg body wt). Strikingly, the repeated treatment resulted in muscle damage within the first 24 h, whereas a single subcutaneous dose of NTG did not produce any muscular damage, and we decided to use a single subcutaneous injection of NTG (Fig. 3).

Periodic acid Schiff-Alcian technique. The fixers (for example, formaldehyde or paraformaldehyde) produced a hypercontraction of the muscle fibers, and the contraction knots appeared blurred. Accordingly, this technique was performed without fixation, with the additional advantage that the cell membranes were preserved, and only extracellular glycosaminoglycans (GAGs) could be seen.

After 30 min of NTG subcutaneous injection (0.1 mg NTG/kg body wt) and working at low magnification, intramus-

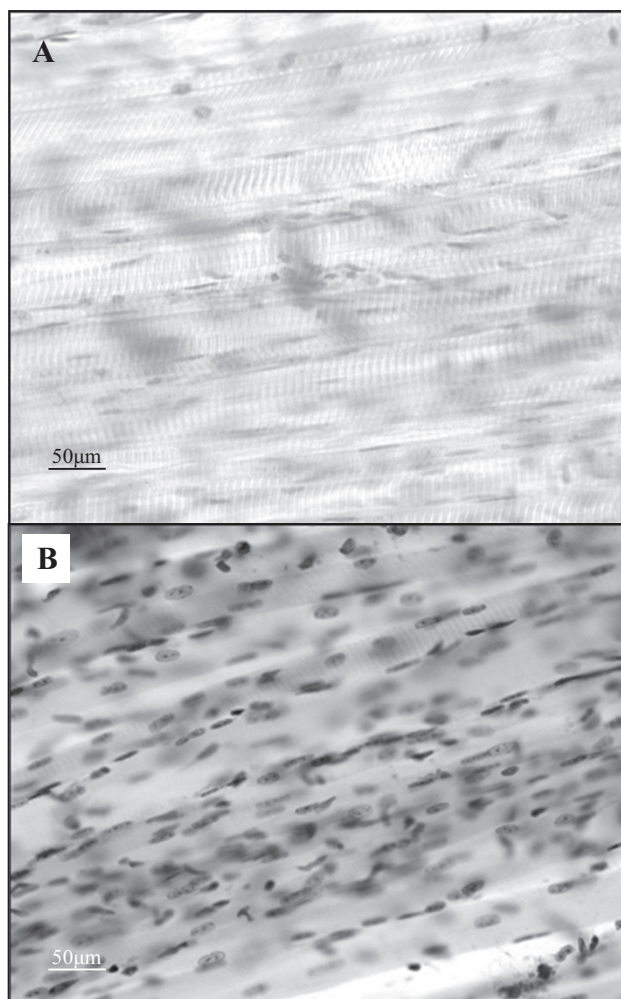


Fig. 3. Muscle injury from repetitive treatment with neostigmine. A: levator auris longus (LAL) muscle 60 min after treatment with neostigmine (NTG). This muscle is completely normal in shape, and we can observe the usual sarcomeres without inflammatory cells. B: LAL 24 h after 2 injections of NTG administered every 12 h. The inflammatory reaction is observed as a large number of nuclei between muscle fibers. The sarcomeres are almost indistinguishable. In all cases, the dose of neostigmine was 0.1 mg/kg body wt.

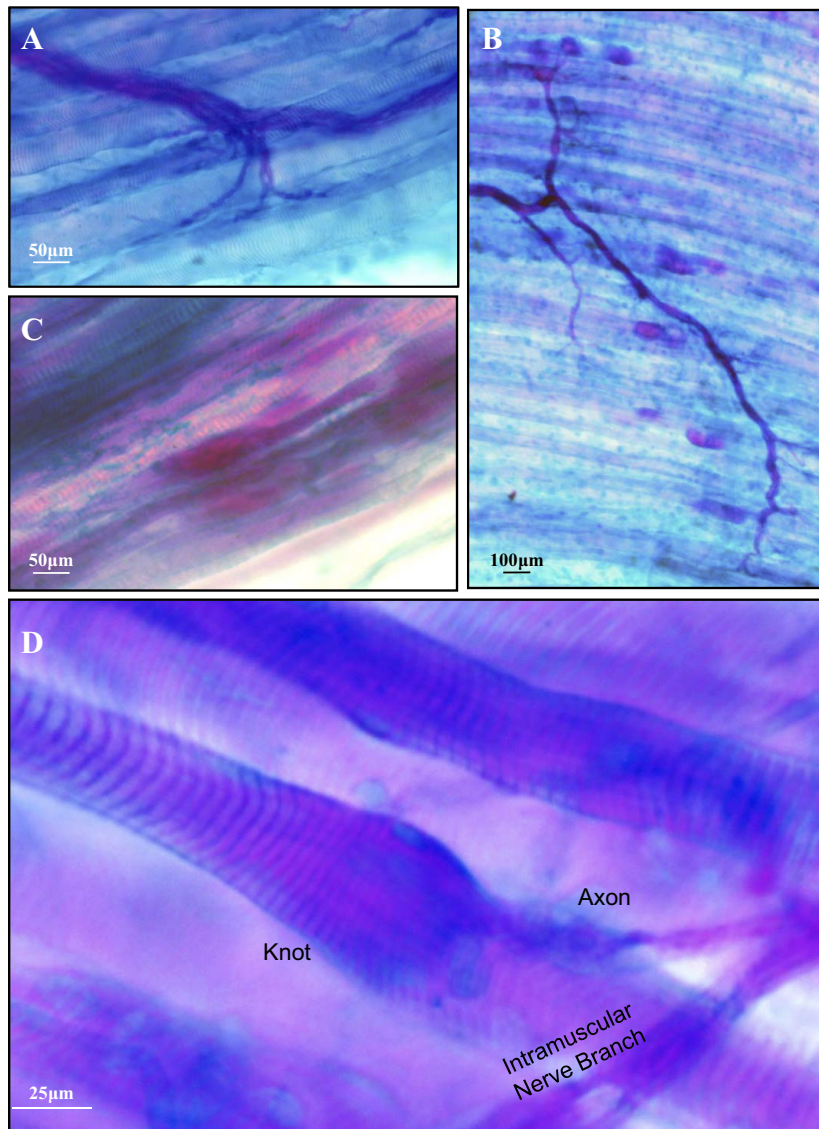


Fig. 4. Periodic acid Schiff (PAS)-Alcian technique. *A*: control muscle; note that there are no knots of contraction. *B*: PAS-positive knots of contraction surrounding an intramuscular nerve branch 30 min after a subcutaneous administration of neostigmine. *C*: 72 h after a subcutaneous injection of neostigmine, some knots of contraction are still present. *D*: details of a knot of contraction. A thickening of the muscle fiber is identified by more tight sarcomeres. The axon innervating the fiber is clearly identified. Pink color indicates the existence of neutral glycosaminoglycans (GAGs), and bluish color indicates the presence of acidic GAGs 30 min after a subcutaneous administration of neostigmine. All images have been obtained from the levator auris longus (LAL) muscle.

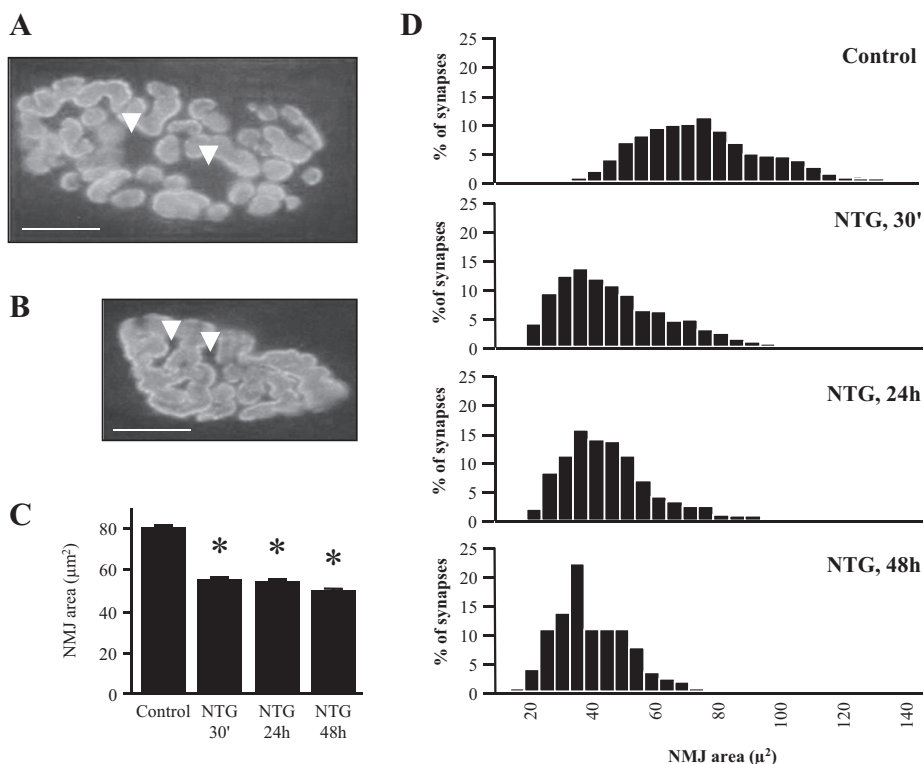
cular nerves surrounded by nodules as grapes could be identified (see Fig. 4A). Using high magnification, a local thickening of the muscle fiber could be observed showing shortened sarcomeres; occasionally, it could even be seen how an axon reached a node (see Fig. 4B). These nodular images are compatible with those previously described as contraction knots by Simons (29). Moreover, this large increase can be seen with some pink coloration indicating the presence of neutral GAGs and a bluish color indicating the presence of acid GAGs. After a single subcutaneous injection of NTG, the frequency of contraction knots decreases progressively within 24 to 48 h. At 3 days posttreatment, the contraction knots are scarce (see Fig. 4C), and 4 days after treatment the contraction knots have completely disappeared.

Histochemical techniques. Although in Fig. 4B we can see an axon reaching the contraction knot, it is necessary to demonstrate a direct relationship between contraction knots and neuromuscular synapses.

The rhodaminated α -bungarotoxin is a toxin that labels acetylcholine receptors (AChR). The AChR are in the postsyn-

aptic component on the muscle fiber membrane. This technique shows an image of the postsynaptic component under the axon. As shown in the control (Fig. 5A) between axonal branches, there are spaces (arrowheads), whereas these spaces disappear in NTG images (Fig. 5B, arrowheads). NTG causes the knot of contraction immediately below the postsynaptic membrane, and thus the image shown by the technique of the rhodaminated α -bungarotoxin is more compact without spaces (Fig. 5B, arrowheads). Initially, we performed a simple count according to the morphology, and it was found that in controls 10% of the muscles showed a contracted morphology at synaptic contacts ($11.65\% \pm 3.22$, $n = 412$ control synapses evaluated). However, 30 min after NTG treatment, 30% of the muscles displayed a contracted morphology at synaptic contacts ($27.10 \pm 6.94\%$; $n = 676$ treated muscle synapses evaluated; treated synapse values with respect to control synapse values: $P = 0.0446$, 834° of freedom). It is important to relate the contraction knots to the neuromuscular synapses. However, the visual simple count is a subjective parameter and might show variations, depending on the experimenter. For this

Fig. 5. Postsynaptic study. *A*: example of a normal synaptic contact (scale bar, 5 μm). *B*: example illustrating contracted synapses; because knots of contraction are under the synaptic areas of each muscular fiber, the shapes of synapses are also contracted (scale bar, 5 μm). Note how the mark-free spaces are lower in *B* (arrowheads). *C*: histogram shows the results of morphometric analyses of postsynaptic areas ($*P < 0.05$, treated values with respect to control values; no. of control synapses analyzed = 444; no. of synapses analyzed after 30 min = 780, $P = 0.0001$, 946° of freedom; no. of synapses analyzed after 24 h = 477, $P = 0.0002$, 687° of freedom; no. of synapses analyzed after 48 h = 182, $P = 0.0001$, 542° of freedom). Note that there is a significant reduction in the treated postsynaptic area. *D*: distribution of synaptic areas from control and treated animals with neostigmine (NTG). Note that overall the curves from treated muscles shift to the left, indicating reduced synaptic areas. No. of synapses analyzed: control, 444; after 30 min, 780; after 24 h, 477; after 48 h, 182. All the images have been obtained in the levator auris longus (LAL) muscle.



reason, a morphometric study of synaptic areas was conducted, and a significant reduction in the synaptic area of muscles treated with NTG was found (Fig. 5C). These results were processed to study the distribution of frequencies of the synaptic areas measured, and the typically Gaussian curves were obtained (Fig. 5D). The curve shifts to the left in muscles treated with neostigmine. Thus, synaptic contacts after being exposed to NTG are globally contracted, confirming that contraction knots are in the subsynaptic area.

Endplate noise recordings. The electromyographic record (EMG) from a neuromuscular junction is called “endplate noise.” The EMG representation of endplate noise is an increase in the anfractuosity of the baseline (it is more circuitous and rough than habitual). Endplate noise corresponds to the spontaneous release of ACh in several muscular fibers (see Fig. 6A) (7, 16, 29). In our experiments, the frequency of mEPPs generated by a neuromuscular junction is on average one event per second. However, endplate noise is ~50–80 events per second. This means that the monopolar EMG needle is registering ~50–80 different synapses.

To illustrate this, Fig. 6B shows three records: no noise, low level of noise (few events), and a high level of noise (many events). The number of areas with endplate noise increases immediately after treatment with NTG and continues to increase for 24 h (Fig. 6C). Event frequency does not significantly increase immediately in treated or control animals. After 3 h, the treatment group shows increases in event frequency (Fig. 6D).

Muscular ultrasonography. The mouse is an extremely small animal to perform muscular ultrasound or find palpable MTrPs or palpable taut bands. For this reason, we performed some experiments in rats with subcutaneous NTG to confirm that MTrPs signs appeared. As we had previously observed in

mice, 30 min after the injection of NTG, contraction knots could be seen by periodic acid Schiff (PAS)-Alcian technique, the frequency of mEPPs (%change: 212.35 ± 28.55 , $P = 0.0001$, 88° of freedom, $n = 45$ synapses from 3 LAL-treated muscles, 3 rats), and the number of areas with endplate noise increased (%change: 150.87 ± 5.37 , $P = 0.0329$, 2° of freedom, 3 gastrocnemius treated from 3 rats). The number of areas with endplate noise continued to increase for 24 h (%change: 180.33 ± 8.75 , $P = 0.0489$, 2° of freedom, 3 gastrocnemius treated from 3 rats).

Thirty minutes after the injection of NTG, taut bands could be palpated in gastrocnemius. Five expert physiotherapists identified taut bands in six rats on 3 different days (2 rats each day) at both 30 min and 24 h after NTG treatment. Taut bands were palpated in all treated gastrocnemius. Nevertheless, the nodular characteristic often felt when palpating human MTrPs could never be felt by palpation in this model. To manipulate the rats without risk to physiotherapists or stress to the animals, the rats were sedated with a low dose of TBE. Unfortunately, this procedure prevented us from knowing whether the animals experienced pain.

After the taut band was identified, dry needling was performed with multiple rapid insertions of a solid filament needle, and palpable local twitch responses were elicited in the right gastrocnemius. These local twitch responses could not be seen but could be identified by palpation. To get more objective evidence of these twitches, the dry needling procedure was applied with diagnostic ultrasound monitoring, and several local twitch responses were shown only in treated animals (Supplemental Videos S1 and S2; Supplemental Material for this article can be found on the *Journal of Applied Physiology* website). Moreover, before treatment with NTG, no taut band was palpated, and no local twitch response was elicited with

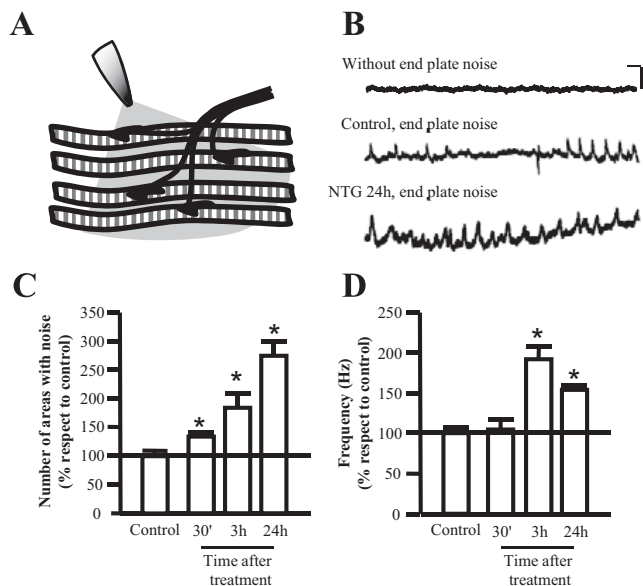


Fig. 6. Endplate noise. *A*: electromyographic recording scheme. The recording electrode reaches the vicinity of an area of neuromuscular synapses (black). A concentric needle covers a recorded field (gray) from several synapses. *B*: examples of electromyographic recordings. Note a significant increase in the no. of events in the gastrocnemius treated with neostigmine (NTG; 3 records show a lapse of time of 100 ms). Vertical bar, 50 μ V; horizontal bar, 25 ms. *C*: no. of areas with endplate noise in gastrocnemius; in treated animals the no. of areas with endplate noise increased compared with their respective controls from the first 30 min to 24 h. Thirty minutes after treatment compared with control values, $P = 0.0001$, 16° of freedom, $n = 12$ animals; Three hours after treatment compared with control values, $P = 0.0011$, 13° of freedom, $n = 12$ animals; 24 h after treatment compared with control values, $P = 0.0001$, 12° of freedom, $n = 12$ animals. *D*: each area with endplate noise was analyzed by quantifying the no. of events/s (Hz). Thirty minutes after treatment with NTG, new areas with endplate noise appear, but these areas initially do not show an increase in the frequency of events. The increase in the frequency of events appears 3 h later. Thirty minutes after treatment compared with control values, $P = 0.7143$, 11° of freedom, $n = 12$ animals; Three hours after treatment compared with control values, $P = 0.0001$, 11° of freedom, $n = 12$ animals; 24 h after treatment compared with control values, $P = 0.0001$, 14° of freedom, $n = 12$ animals. * $P < 0.05$, experimental values compared with control values.

dry needling in left gastrocnemius. In the same animals, 30 min after NTG treatment, taut bands could be palpated, and multiple local twitch responses could be elicited by dry needling in the right limbs.

DISCUSSION

Our results show that a sustained increase of ACh in the synaptic cleft induces contraction knots in the subsynaptic area as well as an increase of the endplate noise and mEPPs frequency. These contraction knots are surrounded by abundant glycosaminoglycans (GAGs). Presumably, in human muscles, both the whole of the contraction knots together with accumulated glycosaminoglycans could contribute to the nodular appearance often felt when myofascial trigger points (MTrPs) are palpated. Unfortunately, in our animal model we could not feel such a nodular characteristic in the palpated taut bands, probably because of the small size of muscles and the limitations of palpation in them.

The integrated hypothesis is one of the most widely accepted pathophysiological explanations of myofascial pain syndrome

(MPS) (10, 29). According to this hypothesis, an excessive secretion of ACh initiates a cascade of events leading to the formation of contraction knots. Thus, artificially increasing ACh in the synaptic cleft, the contraction knots should be obtained in animals. To increase the ACh in the synaptic cleft, we tried several anticholinesterases. The best results were obtained with a single subcutaneous injection of NTG administered at doses commonly used with therapeutic purposes in humans (3, 5, 15). We also explored two types of muscles: a slow-twitch muscle (diaphragm) and a fast-twitch muscle [levator auris longus (LAL)]. After treatment with neostigmine, spontaneous ACh release is more important in LAL muscle than in the diaphragm muscle. It is possible that neostigmine is more effective in phasic muscles such as LAL than in tonics such as the diaphragm.

In recent years, several authors have been looking for an image of contraction knots (13, 14, 21). Mense et al. (21) experimentally increased the ACh in the synaptic cleft using a well-known ACh inhibitor. The anticholinesterase agent employed is also a fluorochrome [diisopropylfluorophosphate (DFP)], which allows the morphological study of the neuromuscular junctions at the same time. However, no subsynaptic contraction knots were observed. These authors, suspecting that the chosen anticholinesterase agent was not enough, decided to impose additional neurotransmission by electrical stimulation of the muscles treated with DFP. This combination of an anticholinesterase agent and electrical stimulation caused undesirable muscle damage. In our model, we were able to induce subsynaptic contraction knots by the single administration of the potent anticholinesterase agent neostigmine. Moreover, the thin and flat LAL muscle that we used did not require further manipulations to apply microscopy and electrophysiological techniques (1).

Huang and coworkers (13, 14), looking for an image of contraction knots, created a rat model of myofascial trigger points (MTrPs) by crushing of the vastus medialis muscle of the hindlimb through repeated contusions. The electrophysiological recordings showed high frequency of endplate noise and polyphasic spikes. However, the histological study of their model did not show contraction knots but indirect signs of MTrPs as large muscle fibers with circular or elliptical cross-sectional shapes. By contrast, the animal model described in the present paper shows both true images of contraction knots and endplate noise recordings.

When AChE is inhibited, ACh is not hydrolyzed, and therefore, it accumulates in the synaptic cleft. An increase of ACh in the synaptic cleft causes an increase in the secretion of more ACh (23, 24). Briefly, ACh secreted by the axon activates synaptic metabotropic autoreceptors in the axonal membrane. These receptors are types 1 and 2 muscarinic receptors (mAChR). The synchronous activation of the two mAChR enhances the release of ACh via activation of protein kinases C and A (23). Moreover, during neurotransmission, adenosine compounds are also released. We have described that these adenosine compounds are also involved in modulating the release of ACh (24). Thus, using NTG will increase the mEPPs frequency by several mechanisms.

Intracellular recording of mEPPs is not directly associated with any disease. However, using electromyography in patients with MPS, it is relatively easy to find endplate noise (see for example, Ref. 8), which is classically referred to as mEPP (18).

Endplate noise recording seems pathognomonic of MPS (8). It seems clear that the endplate noise arises largely from the mEPPs, and probably several synapses are involved (8, 17, 18, 31). For this reason, it is important to assess the frequency of endplate noise events. In our experiments, the mEPP frequency increases during the 1st day, as the areas and the frequency of endplate noise events are also increased. Because endplate noise is the electromyographic expression of the spontaneous neurotransmission, it seems reasonable that both endplate noise and mEPP frequency are increased.

The analysis of the electron microscopy images of contraction knots obtained with NTG at therapeutic doses (3, 5, 15) shows that there is always an abnormally enlarged space between adjacent muscle fibers, and sometimes the presence of fibroblasts is evident. The diameter increase of the muscle fiber at the contraction knot is $\sim 1 \mu\text{m}$. Therefore, thousands of muscle fibers with localized contraction knots would be needed to achieve a palpable MTrP in humans. When a MTrP is palpated into a muscle, if it is associated with clinical evidence it is called active, and if it is not associated with clinical evidence, it is called latent. These observations suggest that in the MTrP areas, other factors could also contribute to the palpable nodule in MTrPs. Moreover, the immediate milieu surrounding active MTrP is characterized by a significant increase in the levels of protons, nociceptive, and proinflammatory substances compared with latent MTrPs and normal muscle tissue (25, 26). These substances may sensitize muscle nociceptors, causing muscle hyperalgesia. In turn, fibroblasts, insulted by the low pH and nociceptive substances, would synthesize GAGs (6), which are accumulated in the vicinity of the contraction knots. GAGs are highly hygroscopic and absorb and retain liquid, increasing the volume of the contraction knots zone, which could contribute to increase the size of the MTrP, making it more readily palpable. In our model, we demonstrated the presence of GAGs by PAS-Alcian staining. Although there have been no palpable differences in size, it has been shown by ultrasound imaging that the size of MTrPs is dependent on its degree of activity, with active MTrPs being larger than latent MTrPs (2). Moreover, GAGs can trap substances (see, for example, Ref. 21), such as the nociceptive and sensitizing substances discussed above. These phenomena associated with GAGs could partially explain the release effect commonly described when manual compression and massage techniques are applied (see, for example, Ref. 9) and could add to their mechanisms a hypothetical drainage effect of the MTrP area by squeezing the liquid from the GAGs, reducing its volume and removing nociceptive substances, thereby decreasing pain. Thus, the presence of GAGs in our model brings new insights into the pathophysiology of the MTrP and provides some reasonable arguments for the beneficial therapeutic effects often observed after manual treatments.

One of the most commonly employed techniques in the treatment of MTrPs is dry needling (DN) (4). DN consists of the use of the mechanical stimuli of a needle to either eliminate or inactivate the MTrP for which the elicitation of local twitch responses has proven to be therapeutically useful (11). The local twitch response is pathognomonic of myofascial trigger point (29). In our experiments with rats, we have found both taut bands, which are identified by several expert examiners, and local twitch responses, which are clearly documented by diagnostic ultrasound imaging.

After a single subcutaneous injection of NTG, contraction knots can be seen only from 30 min to 48 h. At 3 days posttreatment, contraction knots are already scarce, and at 4 days they cannot be further observed. Forty-eight hours after the neostigmine injection, mEPP frequency returns to control values. This means that contraction knots persist for some hours after spontaneous neurotransmission is already normalized.

Several factors seem to be implicated in the onset of MPS. For instance, MTrPs are thought to be formed in response to overload, such as different types of forced or maintained contractions (7). Other mechanisms of increased or altered muscle demands include prolonged muscle contraction, such as postural inadequacies in the workplace, proximal nerve compression and the resultant muscle spasm, and posttrauma (29). Moreover, MTrPs are more common in conditions of psychological stress (20). These stress-related triggers are also factors that contribute to the perpetuation of MPS. It is generally accepted that in the absence of perpetuating factors, MTrPs could disappear without treatment when no muscle overload is imposed (29). This might be the reason why the contraction knots induced by NTG injection could disappear in ~ 3 days. Further research is needed to test the hypothesis that contraction knots could last longer if some kind of perpetuating factor was applied to the muscle harboring them.

Limitations of this model are related mainly to the small size of rats and mice that prevents the palpation of the MTrPs. In this model, only the taut band can be palpated in rats. Moreover, the duration of MPs in humans lasts for more than 1 wk; however, our animal model lasts only 3 days, which can be related to the absence of perpetuating factors.

In conclusion, the animal model of MTrPs created by a single subcutaneous injection of neostigmine includes morphological characteristics (contraction knots) electrophysiological signs (mEPP frequency and endplate noise) as well as clinical signs (taut bands and local twitch response elicitation by needling) of the MTrPs. Moreover, we showed for the first time the accumulation of extracellular GAGs, which could contribute to the pathophysiology and the clinical signs of this entity.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly appreciate the suggestions of Dr. M. T. Colomina in the draft of this article. We thank PRIM Fisioterapia for supplying the diagnostic ultrasound device used in this study.

GRANTS

This work is funded by a grant from Instituto de Salud Carlos III, Acción Estratégica en Salud (MMS, PI13/02084), and from the Commission for Universities and Research of the Department of Innovation, Universities and Enterprise of the Generalitat de Catalunya (MB, 2016 FI-B 00909).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.M., M.S., M.B., C.R., S.M., M.P., R.G.-P., and N.O. performed experiments; R.M., M.B., C.R., S.M., M.P., R.G.-P., N.O., J.T., and M.M.S. interpreted results of experiments; R.M., M.S., M.B., C.R., O.M., S.M., M.P., R.G.-P., N.O., J.T., and M.M.S. approved final version of manuscript; M.S., M.B., C.R., S.M., M.P., N.O., and J.T. analyzed data; M.S. and M.M.S. prepared figures; O.M. and M.M.S. drafted manuscript; O.M. and M.M.S. edited and revised manuscript.

REFERENCES

1. **Angaut-Petit D, Molgo J, Connold AL, Faille L.** The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci Lett* 82: 83–88, 1987. doi:10.1016/0304-3940(87)90175-3.
2. **Ballyns JJ, Shah JP, Hammond J, Gebreab T, Gerber LH, Sikdar S.** Objective sonographic measures for characterizing myofascial trigger points associated with cervical pain. *J Ultrasound Med* 30: 1331–1340, 2011. doi:10.7863/jum.2011.30.10.1331.
3. **Blackman JG, Hopkins WG, Milne RJ, Peterson DW.** Supercontracture at endplates of mammalian muscle fibers caused by decamethonium and related agonists. *Proc Univ Otago Med Sch* 56: 71–72, 1978.
4. **Dommerholt J, Grieve R, Hooks T, Layton M.** A critical overview of the current myofascial pain literature - October 2015. *J Bodyw Mov Ther* 19: 736–746, 2015. doi:10.1016/j.jbmt.2015.09.003.
5. **Duxson MJ, Vrbová G.** Inhibition of acetylcholinesterase accelerates axon terminal withdrawal at the developing rat neuromuscular junction. *J Neurocytol* 14: 337–363, 1985. doi:10.1007/BF01217751.
6. **Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB.** Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 242: 27–33, 1997. doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
7. **Gerwin RD, Dommerholt J, Shah JP.** An expansion of Simons' integrated hypothesis of trigger point formation. *Curr Pain Headache Rep* 8: 468–475, 2004. doi:10.1007/s11916-004-0069-x.
8. **Gerwin RD, Shannon S, Hong CZ, Hubbard D, Gevirtz R.** Interrater reliability in myofascial trigger point examination. *Pain* 69: 65–73, 1997. doi:10.1016/S0304-3959(96)03248-4.
9. **Hanten WP, Olson SL, Butts NL, Nowicki AL.** Effectiveness of a home program of ischemic pressure followed by sustained stretch for treatment of myofascial trigger points. *Phys Ther* 80: 997–1003, 2000.
10. **Harden RN, Bruehl SP, Gass S, Niemiec C, Barbick B.** Signs and symptoms of the myofascial pain syndrome: a national survey of pain management providers. *Clin J Pain* 16: 64–72, 2000. doi:10.1097/00002508-200003000-00010.
11. **Hong CZ.** Lidocaine injection versus dry needling to myofascial trigger point. The importance of the local twitch response. *Am J Phys Med Rehabil* 73: 256–263, 1994. doi:10.1097/00002060-199407000-00006.
12. **Hong CZ, Simons DG.** Pathophysiologic and electrophysiologic mechanisms of myofascial trigger points. *Arch Phys Med Rehabil* 79: 863–872, 1998. doi:10.1016/S0003-9993(98)90371-9.
13. **Huang QM, Lv JJ, Ruanshi QM, Liu L.** Spontaneous electrical activities at myofascial trigger points at different stages of recovery from injury in a rat model. *Acupunct Med* 33: 319–324, 2015. [Erratum in *Acupunct Med* 33: 434, 2015.] doi:10.1136/acupmed-2014-010666.
14. **Huang QM, Ye G, Zhao ZY, Lv JJ, Tang L.** Myoelectrical activity and muscle morphology in a rat model of myofascial trigger points induced by blunt trauma to the vastus medialis. *Acupunct Med* 31: 65–73, 2013. doi:10.1136/acupmed-2012-010129.
15. **Hudson CS, Rash JE, Tiedt TN, Albuquerque EX.** Neostigmine-induced alterations at the mammalian neuromuscular junction. II. Ultrastructure. *J Pharmacol Exp Ther* 205: 340–356, 1978.
16. **Jafri MS.** Mechanisms of Myofascial Pain. *Int Sch Res Notices* 2014: pii: 523924, 2014. doi:10.1155/2014/523924.
17. **Kimura J.** Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice. In: *Techniques to Assess Muscle Function*, edited by Kimura J. Oxford, UK: Oxford University Press, 2001.
18. **Liley AW.** An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the rat. *J Physiol* 132: 650–666, 1956. doi:10.1113/jphysiol.1956.sp005555.
19. **McLachlan EM, Martin AR.** Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol* 311: 307–324, 1981. doi:10.1113/jphysiol.1981.sp013586.
20. **McNulty WH, Gevirtz RN, Hubbard DR, Berkoff GM.** Needle electromyographic evaluation of trigger point response to a psychological stressor. *Psychophysiology* 31: 313–316, 1994. doi:10.1111/j.1469-8986.1994.tb02220.x.
21. **Mense S, Simons DG, Hoheisel U, Quenzer B.** Lesions of rat skeletal muscle after local block of acetylcholinesterase and neuromuscular stimulation. *J Appl Physiol* (1985) 94: 2494–2501, 2003. doi:10.1152/jappphysiol.00727.2002.
22. **Santafé MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomàs J.** Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci* 23: 2048–2056, 2006. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04753.x.
23. **Santafé MM, Priego M, Obis T, Garcia N, Tomàs M, Lanuza MA, Tomàs J.** Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *Eur J Neurosci* 42: 1775–1787, 2015. doi:10.1111/ejn.12922.
24. **Shah JP, Gilliams EA.** Uncovering the biochemical milieu of myofascial trigger points using in vivo microdialysis: an application of muscle pain concepts to myofascial pain syndrome. *J Bodyw Mov Ther* 12: 371–384, 2008. doi:10.1016/j.jbmt.2008.06.006.
25. **Shah JP, Phillips TM, Danoff JV, Gerber LH.** An in vivo microanalytical technique for measuring the local biochemical milieu of human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 99: 1977–1984, 2005. doi:10.1152/jappphysiol.00419.2005.
26. **Simons DG.** Review of enigmatic MTrPs as a common cause of enigmatic musculoskeletal pain and dysfunction. *J Electromyogr Kinesiol* 14: 95–107, 2004. doi:10.1016/j.jelekin.2003.09.018.
27. **Simons DG, Stolov WC.** Microscopic features and transient contraction of palpable bands in canine muscle. *Am J Phys Med* 55: 65–88, 1976.
28. **Simons DG, Travell JG, Simons LS.** *Myofascial Pain and Dysfunction: The Trigger Point Manual*. Philadelphia, PA: Lippincott William & Wilkins, 1999.
29. **Turo D, Otto P, Shah JP, Heimur J, Gebreab T, Zaazhoa M, Armstrong K, Gerber LH, Sikdar S.** Ultrasonic characterization of the upper trapezius muscle in patients with chronic neck pain. *Ultrason Imaging* 35: 173–187, 2013. doi:10.1177/0161734612472408.
30. **Wiederholt WC.** "End-plate noise" in electromyography. *Neurology* 20: 214–224, 1970. doi:10.1212/WNL.20.3.214.

**4.2. ARTICULO 2 PERCUTANEOUS APPLICATION OF GALVANIC
CURRENT IN RODENTS REVERSES SIGNS OF MYOFASCIAL TRIGGER
POINTS.**

4.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ARTICULO 2. PERCUTANEOUS APPLICATION OF GALVANIC CURRENT IN RODENTS REVERSES SIGNS OF MYOFASCIAL TRIGGER POINTS.

1. Evaluar los cambios electrofisiológicos intracelulares e histológicos de la corriente galvánica (CG) en músculos sanos no tratados.
 - a. Efectos con el protocolo 3 miliamperios (mA), 3 segundos 3 aplicaciones.
2. Evaluar los cambios electrofisiológicos intracelulares e histológicos de la CG sobre el modelo animal con PGM (tratados con anti-AChE).
 - a. Efectos con el protocolo 0.4mA, 5 segundos y 4 aplicaciones
 - b. Efectos con el protocolo 1.5mA, 5 segundos y 3 repeticiones.
 - c. Efectos con el protocolo 3mA, 3 segundos 3 aplicaciones.
3. Estudiar los cambios electromiográficos (núm. de áreas y ruido de placa) generados por la CG en los músculos sanos, evaluando el número de áreas y ruido de placa.
4. Analizar los cambios electromiográficos (núm. de áreas y ruido de placa) generados por el tratamiento con CG, en el modelo animal con PGM.
5. Estudiar y comparar los efectos entre el tratamiento con punción seca (PS) y CG, sobre la respuesta de espasmo local (REL) mediante ecografía, en el modelo animal con PGM.

4.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS ESPECÍFICOS DEL ARTÍCULO 2.

4.2.2.1. Estudio electrofisiológico.

Una vez establecido el procedimiento que permite replicar el desarrollo de PGM en rata y ratón se ha procedido a evaluar el efecto de las corrientes galvánicas evaluando distintos protocolos de tratamiento. Para la administración de los tratamientos de corriente galvánica, en LAL y gastrocnemios, se utilizó el equipo Physio Invasiva (Cesmar Electromedicina S.L. Sant Pere de Ribes, España).

Los protocolos de CG evaluados son: 0.4mA, 5 segundos y 4 aplicaciones, 1.5mA, 5 segundos y 3 repeticiones, 3mA, 3 segundos y 3 aplicaciones.

Las agujas utilizadas para aplicar el tratamiento son Physio Invasiva 0.30x40mm (Prim Fisioterapia. Móstoles. Spain).

4.2.2.1.1. Registros intracelulares

Inicialmente se evaluó el efecto de las CG en un grupo de ratones con músculos LAL sanos. En el caso del grupo tratado se evaluaron el efecto de los distintos protocolos a las 3 y 24 horas después de aplicar las corrientes. Los registros intracelulares se realizaron siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 3 de metodología general.

4.2.2.1.2. Registros electromiográficos

Los registros se realizaron en gastrocnemios de ratones, que fueron tratados con NTG subcutánea para desarrollar los PGMs, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3 de metodología general. Después del periodo de incubación de 30 minutos y 24 horas, se realizaron los registros electromiográficos de control (sin tratamiento de CG), evaluando el número de áreas y frecuencia del ruido de placa en la pierna izquierda y los registros experimento, en la pata derecha, tratada con el protocolo de CG correspondiente en cada grupo.

4.2.2.2. Estudio de la REL mediante ecografía.

Los experimentos con ecografía se realizaron siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 3 de metodología general para identificar la REL en el modelo con PGM, con la variación que en este trabajo se evaluó y comparo el efecto entre los tratamientos de PS en la pierna izquierda y CGI en la derecha. Para ello, en el gastrocnemio izquierdo, se realizó un reconocimiento manual, identificación del a zona con REL y aplicación del tratamiento con punción seca (tres inserciones durante 3 segundos, una inserción por segundo) en la misma zona. Luego, se realizó el mismo procedimiento para reconocer un área con PGM en el

gastrocnemio derecho, cuando se identificó una respuesta de espasmo local, la aguja se dejó en esa área y se aplicó el protocolo de corriente eléctrica, 3mA / 3 segundos / 3 aplicaciones.

Durante ambos procedimientos, se monitorizo y grabo toda la actividad mediante ecografía y posteriormente se analizó la intensidad a baja velocidad, utilizando el programa de análisis de movimiento Kinovea (<https://www.kinovea.org/>). La respuesta de espasmo local puede verse mediante la técnica de ultrasonido como un área discreta. Esta área se denomina "área de REL". Como se puede ver en la figura 2 del artículo 2, se determinó el área REL la distancia desde el punto al comienzo de la REL y la tibia (X1) y la distancia desde el punto al final de la REL y la tibia (X2). En todos los casos se realizaron tres mediciones y se obtuvo la media. La resta de X1-X2 es la distancia recorrida por la REL durante el espasmo. La duración total de la REL fue extraída de los analizadores de video. Estos parámetros se utilizaron para calcular la velocidad (v) del REL: $v = (X1 - X2) / \text{duración REL}$.

Research Article

Percutaneous Application of Galvanic Current in Rodents Reverses Signs of Myofascial Trigger Points

**R. Margalef,¹ M. Bosque,¹ P. Monclús,¹ P. Flores,¹ F. Minaya-Muñoz,^{2,3}
F. Valera-Garrido,^{2,3,4} and M. M. Santafé¹**

¹Unit of Histology and Neurobiology, Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University, Carrer St. Llorenç, No. 21, 43201 Reus, Spain

²MVClinic Institute, Madrid, Spain

³CEU San Pablo University, Madrid, Spain

⁴Getafe C.F., Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to M. M. Santafé; manuel.santafe@urv.cat

Received 27 November 2019; Revised 11 April 2020; Accepted 24 April 2020; Published 28 May 2020

Academic Editor: Albert Moraska

Copyright © 2020 R. Margalef et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

An increase in the spontaneous release of acetylcholine (ACh) at the motor endplate is directly related to the generation of myofascial trigger points (MTrPs). In this study, percutaneous electric fields were applied to an animal model of MTrPs with high levels of spontaneous ACh release. All experiments were performed on Swiss mice and Sprague Dawley rats. For evaluating the spontaneous neurotransmission, intracellular recordings were performed, and the frequency of miniature endplate potentials was evaluated. Electromyographic recordings were also conducted to evaluate the endplate noise. Finally, the number and strength of local twitch responses (LTR) were evaluated using ultrasound recordings. The protocols used for the electric currents were 0.4 mA for five seconds and four repetitions (protocol 1), 1.5 mA for five seconds and three repetitions (protocol 2), and 3 mA for three seconds and three repetitions (protocol 3). After a subcutaneous injection of neostigmine (NTG), a great increase was observed in the frequency of mEPPs, together with an elevated endplate noise. Protocols 2 and 3 were the most effective. Protocol 3 could completely reverse the action of NTG at both three hours and 24 hours, respectively. The application of percutaneous currents produced both an increase in the number (144%) and in the speed (230% faster) of LTR compared with dry needling. In conclusion, higher doses of electrical current are more effective for decreasing MTrPs findings in an animal model.

1. Introduction

Myofascial trigger points (MTrPs) can generate a characteristic type of muscle pain called myofascial pain syndrome (MPS), encompassing sensory, motor, and autonomic symptoms [1, 2]. MTrPs are hyperirritable nodules within taut bands of skeletal muscle responsible. MPS is very common in humans, and it is estimated that almost everyone might suffer an episode at least once during their lifetime [3].

An increase in ACh released spontaneously at the level of the motor endplate is directly related to the generation of myofascial trigger points (MTrPs) [1, 4]. The increase in spontaneously released ACh may be recorded electromyographically via a characteristic recording known as endplate noise [5, 6]. We have recently reported the accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) in the area of MTrPs [4]. These GAGs can trap

substances, such as nociceptive and sensitize substances, contributing, in part, to the clinical symptoms of MPS [7].

One of the therapeutic interventions employed in the treatment of MTrPs is dry needling (DN). This consists of the use of mechanical stimuli applied via a needle to either eliminate or inactivate the MTrP and thus obtain therapeutic benefits [8]. One of the possible benefits is the destruction of the dysfunctional neuromuscular junctions that cause the MTrPs [1] and, consequently, the replacement of these synapses by nerve regeneration [9]. Moreover, this local muscle destruction involves an inflammatory reaction [9] that can remove the GAGs, together with trapped substances. During the DN of the MTrP, a visible contraction of a part of the muscle, known as the local twitch response (LTR), is often elicited [10]. Some authors suggest that DN is more effective if an LTR is obtained during the procedure

[10–12]. There are studies that obtain clinical benefits without the existence of LTR. For example, Hakim et al. [13] working with patients with active MTrP in the upper trapezius muscle obtained that the DN without causing LTR has superiority over the DN along with causing LTR in clinical parameters that include pain, pressure threshold, and the range of lateral flexion movement of the neck. If the LTR occurs, the contraction induced in the area of the MTrP could help to clear nociceptive substances associated with GAGs reduction of pain.

The use of percutaneous electric currents is increasing in modern medicine [14, 15]. Electric currents can accelerate muscle regeneration [16] and tendon repair [17], as well as influence the growth of several cancer cells [18]. Moreover, several studies have reported that cells can directionally respond to electric fields, applied in both in vitro and in vivo settings, via a phenomenon called electrotaxis [19]. Endothelial electrotaxis is also involved in angiogenesis [20], and the application of percutaneous electric currents can affect inflammatory mediators in damaged muscle tissue and promote a fresh vascularization of the injured area [21]. Thus, both the angiogenesis and electrotaxis of inflammatory cells may be beneficial for the treatment of MTrPs. Furthermore, electric currents cause muscle contraction, which is secondary to depolarization of muscular fibers and motor axons [22, 23], thus contributing to immediate reduction in pain. Till date, only a few studies have been conducted on the use of percutaneous electrical fields on MTrP.

The main objective of this study is to evaluate if the different forms of electrical currents commonly used in clinical interventions can be useful in the treatment of MPS. For that, a model of myofascial trigger points (MTrPs) is obtained when neostigmine is injected in mice. In this model, the neuromuscular neurotransmission is increased. Using percutaneous electric currents, the action of neostigmine is reversed at both three and 24 hours. Moreover, the application of electric currents produced an increase in the number and in the speed of local twitch responses compared to dry needling.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. Experiments were performed on young adult male Swiss mice (45 to 50 days postnatal, $n = 35$) and Sprague Dawley rats (60 to 70 days postnatal, $n = 6$; Charles River, L'Arbresle, France). All experiments were carried out in the vivarium and in the neurophysiology laboratory of the Faculty of Medicine of the Rovira i Virgili University. Animals were housed in standard MAKROLON^R cages ($27 \times 27 \times 14$ cm³ for mice and $52 \times 28 \times 15$ cm³ for rats), and two animals were distributed for each cage. Temperature was maintained at 20°C–22°C by an electronic thermostat, and a relative humidity was fixed at 60–70%. The circadian rhythms were 12 hours of white neon light and 12 hours of darkness. Feeding and hydration of animals has been *ad libitum*, based on the VRF-1 mouse and A.04 PANLAB^R rat feed supplied by (PANLAB, Spain) and chlorinated regular tap water. The animals were cared for in accordance with the guidelines of the European Community's Council Directive

of 24th November, 1986 (86/609/EEC) and the Spanish Royal Decree 53/2013 for the humane treatment of laboratory animals. This study was approved by the Ethics Committee of the Rovira i Virgili University.

2.2. Muscles. Animals were anaesthetized with 2% tribromoethanol (0.15 ml/10 g body weight, I.P.) and put to death by exsanguination while deeply anaesthetized. Tribromoethanol has been chosen because it is a rapidly reversible anesthetic that does not affect the peripheral nervous system. The levator auris longus (LAL) was excised and dissected on a Sylgard-coated Petri dish containing normal Ringer solution continuously bubbled with 95% O₂/5% CO₂. The LAL muscle was used for the electrophysiological study, and the gastrocnemius muscles were used for electromyography and ultrasonographic recordings.

2.3. Anticholinesterasic Exposure. Neostigmine methyl sulfate (NTG; 0.1 mg NTG/kg body weight; Sigma) was injected subcutaneously (thoracolumbar area) into the adult male Swiss mice. To ensure the correct drug administration, a cholinergic syndrome should appear within 30 minutes posttreatment (for further details, see Margalef et al. [4]).

2.4. Procedure with Electric Currents. Figure 1 shows the timeline and the experimental procedure used. Thirty minutes after injecting the neostigmine, electric/galvanic current was applied directly to the gastrocnemius muscles and LAL. The parameters analyzed were intensity, time in seconds, and the number of repetitions. These were described by three numerical values in the same order (for example, 3 mA for three seconds and three repetitions, i.e., 3:3:3) [24]. The protocols with continuous direct current used were 0.4 mA for five seconds and four repetitions (protocol 0.4:5:4), 1.5 mA for five seconds and three repetitions (protocol 1.5:5:3), and 3 mA for three seconds and three repetitions (protocol 3:3:3). Additionally, some experiments have been carried out using microcurrent stimulation: the intensity for 10 minutes was set at 10⁻⁶ mA and the frequency at 10 Hz (10⁻⁶ mA/10 Hz/10 min). A specifically developed medically certified device (Physio Invasiva[®], PRIM Physio, Spain) was used for application of electrical current. The electromyography record and the intracellular recordings were taken three hours and 24 hours after applying the currents.

2.5. Electrophysiology: Intracellular Recordings. Spontaneous miniature endplate potentials (mEPPs) were recorded intracellularly with conventional glass microelectrodes filled with 3M KCl (20–40 MΩ resistance). Records were rejected if the membrane potential (Vm) was < -50 mV or if it fell by more than 5 mV during the recording period.

The recording electrodes were connected to an amplifier (Tecktronics, AMS02). A distant Ag–AgCl electrode connected to the bath solution via an Agar bridge (Agar 3.5% in 137 mMNaCl) was used as a reference. The MEPPs were digitized (DIGIDATA 1200 Interface, Axon Instruments Inc, CA), stored, and analyzed using a computer. The Axoscope 10.2 was

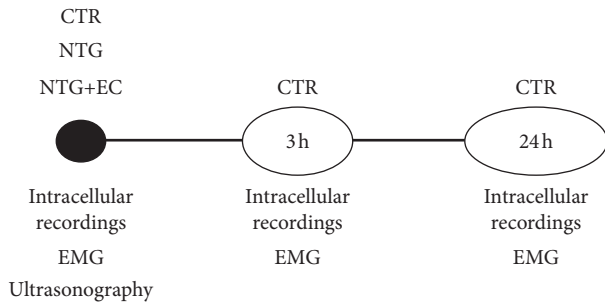


FIGURE 1: Timeline of the experimental procedure. CTR, control; NTG, neostigmine; EC + NTG, electric currents applied to animals treated with neostigmine. In the lower part of the line there are experimental methodologies: intracellular recordings in mice; EMG, electromyography in mice; Ultrasonography is performed in rats.

used (Axon Instruments Inc.) for data acquisition and analysis. The MEPP frequency was recorded for 100s from at least 15 different neuromuscular junctions, and the mean values were determined. The mean amplitude (mV) per fiber was calculated and corrected for nonlinear summation [25], assuming a membrane potential of -80 mV. We proceeded as follows: NTG was injected subcutaneously into adult male Swiss mice. When the acute cholinergic syndrome disappeared (30 minutes), the sample was normally excised and dissected as explained above, and mEPPs were recorded from at least 15 different neuromuscular junctions.

2.6. Endplate Noise Recordings. The needle EMG (nEMG) records were always obtained from an anesthetized animal at a controlled room temperature of between 22°C and 25.8°C . The muscle used for this study was the gastrocnemius due to its easy access and suitability for the study. Registers were obtained using an electromyography system (MedelecMystro plus, GR20) with a monopolar EMG needle (Natus Manufacturing Limited). The needle was slowly inserted into the muscle, and once inside, it was moved to record in all directions. The muscle was divided into twelve areas to cover the entire muscle and to avoid registering the same endplate noise twice. The recording needle was introduced into the gastrocnemius until an audible change in sound was heard. The electromyography screen was then studied, and if it was correct (without an alternating current, artifacts, etc.), the endplate noise was recorded. The number of areas with endplate noise (maximum 12) was recorded. While the endplate noise was being recorded, we studied the frequency to know the number of potentials per second that appeared, expressed in Hz.

The experiments were performed as follows: (1) subcutaneous injection of NTG, (2) the animal displayed cholinergic syndrome, (3) a control nEMG recording was performed in the left gastrocnemius, and (4) nEMG examination of the right gastrocnemius muscle.

2.7. Ultrasonography. Muscular ultrasonography was performed in rats using an ultrasound device (General Electric, LOGIQ E R7) and a transducer (General Electric, L10-22-

RS). A LTR was considered in the event of a sudden and localized movement occurring when the needle was inserted into the muscle (see examples by Margalef et al. [4]). Ultrasound needle within tissues is identified as a bright line that penetrates tissue or only as a reflection of the tip. If a sudden and very localized movement when the needle is inserted into the muscle is seen, it is considered to be a local twitch response (LTR). That LTR can be viewed with ultrasound technique as a very discreet area (see supplemental videos). This area is called the “LTR area.” If the needle insertion only shows the tip deforming the tissue while penetrating, it is considered that the local twitch response has not occurred. First, rats were treated with neostigmine, and after 30 minutes, the muscles were palpated in order to identify an area with a taut band. In these areas, LTRs occurred in response to the insertion of a solid filament needle in both legs. Next, three needle insertions were performed, one insertion per second, in the left gastrocnemius. Thereafter, the same procedure was performed in the right gastrocnemius in order to identify a taut band area. When the area was identified, the needle was inserted, and an electric current protocol was applied (protocol 1.5:5:3). Initially, an abrupt contraction of the entire muscle is observed through the application of percutaneous electrical currents. After that, LTRs appear as highly localized movements in a very discrete area of the muscle.

During both procedures, ultrasound images were recorded and subsequently analyzed at low speed, using the Kinovea movement analysis program (<https://www.kinovea.org/>). The intensity of the LTR was evaluated using image analysis. We assessed the rate of change as an indicator of power. This was done as follows (see Figure 2): once an LTR area was identified, we measured the distance from both points, at the beginning of the LTR and the tibia, and the distance from the point the LTR ended and the tibia (average of three measurements). The subtraction of these two values is known as the LTR-distance. The LTR duration extracted from video analyzers was used to calculate the speed of the LTR:

$$v = \frac{\text{distance before the LTR} - \text{distance after the LTR}}{\text{LTR duration}} \quad (1)$$

2.8. Statistical Procedure. Values are expressed as mean \pm SEM. Sometimes, the values are expressed as “percentage of change.” This is defined as: (experimental value/control value) \times 100. We used the two-tailed Welch’s *t*-test for unpaired values because our variances were not equal. We prefer this test as it is more conservative than the ordinary *t*-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

In this study, an animal model of MTrPs was used, generated by the subcutaneous injection of neostigmine (NTG). In this animal model of MTrPs, several clinical signs of MTrPs can be observed: an elevated endplate noise compared to the

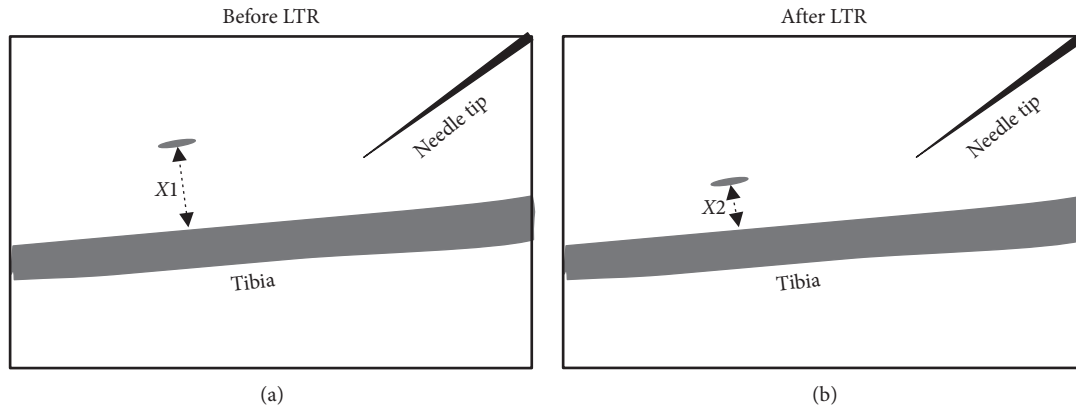


FIGURE 2: Determination of speed of the local twitch response. The local twitch response (LTR) can be seen by ultrasound technique as a very discreet area (gray ellipse; see supplementary videos). This area is called the “LTR area.” After determining the LTR area, the distance from the point at the beginning of the LTR and the tibia (X_1) and the distance from the point at the end of the LTR and the tibia (X_2) were measured. In all cases, three measurements were made. $X_1 - X_2$ = distance traveled by the LTR during the spasm. The total LTR duration was extracted from the video analyzers. These parameters were used to calculate the speed (v) of LTR: $v = (X_1 - X_2) / \text{LTR duration}$.

norm, as evidenced by the electromyographic recording; many muscular fibers with contraction knots (narrower sarcomeres and locally thickened muscle fiber) surrounded by the infiltration of connective tissue, such as molecules of glycosaminoglycan; and palpable taut bands and LTRs in response to needle stimulation.

3.1. Intracellular Recording. To rule out a possible adverse effect of the electrical currents, initially, spontaneous neurotransmission in healthy muscles was evaluated. By applying electrical currents in healthy muscles, the frequency of miniature endplate potentials (mEPPs) was neither modified after three hours (% change: $2.40\% \pm 5.88$, $P > 0.05$, $N = 5$ muscles, 75 fibers) nor 24 hours thereafter (% change: $12.45\% \pm 11.32$, $P > 0.05$, $N = 3$ muscles, 45 fibers).

A high increase in the frequency of mEPPs (about 300%) was obtained in the LAL muscle 30 minutes after a subcutaneous injection of the NTG (0.1 mg NTG/kg body weight) (Figure 3). The mEPPs were only reduced to 30% with the 0.4:5:4 protocol and to 50% (Figure 3(a)) with the 1.5:5:3 protocol of electric currents (Figure 3(b)). The 3:3:3 protocol completely reverses the frequency of the mEPPs to control values (Figure 3(c)). When the frequency of mEPPs was evaluated 24 hours later, similar values were obtained. The mEPPs frequency was slightly reduced ($\approx 27\%$) by the 0.4:5:4 protocol, 1.5:5:3 reduced it slightly more ($\approx 50\%$), and the complete reversion was achieved with the 3:3:3 protocol (Figure 3).

Lower intensity protocols were also used, such as 10^{-6} mA 10 Hz-100 μ s, for a longer duration (10 minutes), which is a common protocol used in clinical practice. This protocol was revealed to be ineffective, as the frequency of mEPPs was still more elevated ($\approx 235\%$) at three hours compared to those observed in the controls (mEPPs frequency, experiment: 114.99 ± 23.35 ; controls: 48.87 ± 5.28 ; $n = 3$ animals, minimum of 15 fibers per muscle; $P < 0.05$) and at 24 hours (mEPPs frequency, experiment: 124.32 ± 20.43 ; controls: 48.87 ± 5.28 ; $n = 3$ animals, minimum of 15 fibers per muscle, $P < 0.05$).

3.2. Electromyography. Similar to what was observed in the intracellular recordings, electric currents in healthy muscles did not change the number of areas with endplate noise after either three hours (% variation: $15.21\% \pm 8.23$, $P > 0.05$, $N = 5$ mice) or 24 hours (% variation: $1.43\% \pm 7.05$, $P > 0.05$, $N = 3$ mice). The frequency of endplate noise was not modified in any control group (% variation at 3h: $0.53\% \pm 5.66$, $N = 5$ mice; % variation at 24 hours: $4.04\% \pm 2.80$, $N = 3$ mice; $P > 0.05$ in both cases).

Electromyography recordings revealed an elevated endplate noise in the gastrocnemius muscle of animals treated with neostigmine. The results of electromyography coincide with the results obtained in the intracellular recording experiments using electric currents (Figure 4). Protocols 1.5:5:3 and 3:3:3 completely reversed the action of neostigmine at three hours, and this effect was maintained 24 hours later. This action was identical for both the number of areas with endplate noise and the frequency of events in each of the areas with endplate noise. However, the 0.4:5:3 protocol reduced the number of areas with endplate noise and the frequency, although it did not reverse these completely (Figure 4).

When applying the 10^{-6} mA, 10 Hz, 100 μ s during the 10 minutes protocol, the areas with endplate noise and the mean frequency at each of these areas were still elevated at three hours (% of change: 172.17 ± 5.0 and 180.3 ± 3.2 , respectively, $n = 3$ animals, $P < 0.05$) and at 24 hours (% of change: 262 ± 2.0 and 146.1 ± 3.5 , respectively, $n = 3$ animals, $P < 0.05$).

3.3. Ultrasonography. Thirty minutes after the NTG injection and after identifying the taut band, the DN was performed with multiple quick insertions using a solid filament needle, from which about two LTRs were removed in the right gastrocnemius (1.59 ± 0.16). Subsequently, another solid filament needle was inserted into the left gastrocnemius, until an LTR was obtained. Then, electrical currents were applied through that needle. After a massive

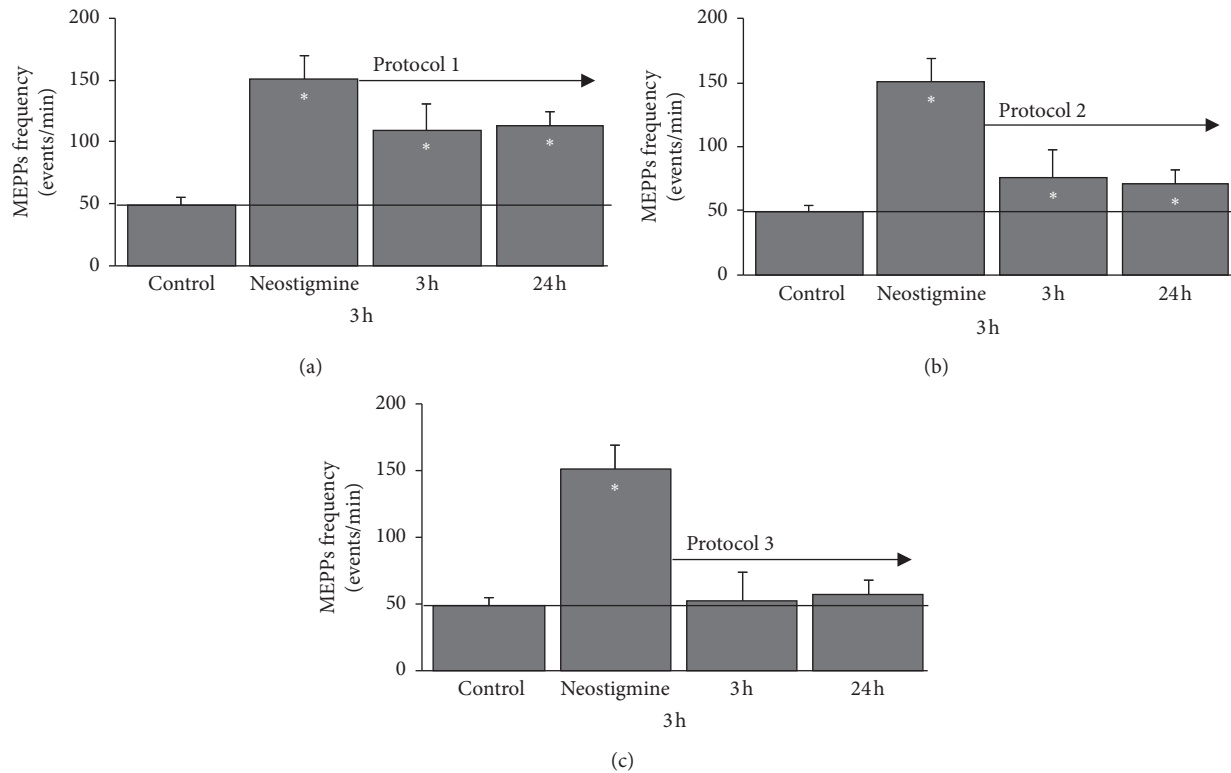


FIGURE 3: Intracellular recordings. After the subcutaneous injection of neostigmine, several electric current protocols have been applied: (a) protocol 1 (4 repetitions of 0.4 mA for 5 seconds), (b) protocol 2 (3 repetitions of 1.5 mA for 5 seconds), and (c) protocol 3 (3 repetitions of 3 mA for 3 seconds). The recordings were made 3 hours and 24 hours after applying the protocols. The values are expressed in events per minute (mean \pm SEM). Control = 7 muscles; 66 fibers were recorded in total. Neostigmine = 5 muscles; 45 fibers recorded in total. (neostigmine + protocol 1) = 3 muscle; 39 fibers were recorded in total. (neostigmine + protocol 2) = 4 muscles; 36 fibers were recorded in total. (neostigmine + protocol 3) = 4 muscles; 71 fibers were recorded in total. (neostigmine + protocol 1) = 3 muscles; 40 fibers recorded in total. (neostigmine + protocol 2) = 3 muscles; 36 fibers were recorded in total. (neostigmine + protocol 3) = 3 muscles; 56 fibers were recorded in total. * $P < 0.05$ with respect to control values.

contraction of the entire muscle, about five extremely fast LTRs were observed (5.04 ± 1.05). Percutaneous electrical currents (protocol 1.5:5:3) produced a 144% increase in LTRs compared to dry needling (Figure 5(a)). In addition, the speed of each LTR was 230% faster with the electric currents than with DN (Figure 5(b)).

4. Discussion

This study evaluated the effects of percutaneous electric currents on an animal model of MTrPs. Several protocols were employed with varying levels of intensity and duration: 10^{-6} mA 10 Hz-100 μ s during 10 minutes, 0.4 mA for five seconds and four repetitions, 1.5 mA for five seconds and three repetitions, and 3 mA for three seconds of and three repetitions. Only the latter protocol completely reversed the high spontaneous neurotransmission achieved with a subcutaneous neostigmine injection to control values. Thus, the number of MEPPs returned to normal values at three hours and remained normal for 24 hours. In addition, the electromyography records also reversed the high values of both the number of areas with endplate noise and the frequency of endplate noise. The four protocols were effective at different degrees. 1.5 mA for 5 seconds and three repetitions and 3 mA

for three seconds and three repetitions were the most effective. In addition, the LTRs elicited by electrical currents compared to those produced by DN have been evaluated and demonstrated to be far more effective electric currents.

Simons' integrated hypothesis [26] postulates that an increase in spontaneous neuromuscular neurotransmission is responsible for a whole cascade of events, resulting in the generation and maintenance of MTrPs. Based on this hypothesis, we have generated MTrPs in mice by increasing the amount of ACh in the synapses with an anticholinesterase agent [4]. In this model, we obtained an increase in the spontaneous release of ACh evidenced by both intracellular electrophysiological recordings of the MEPPs and the electromyography recordings of endplate noise. It is well known that electric currents cause an extensive depolarization of the axonal terminals [27]. In this situation, all the available synaptic vesicles are released, and the nervous terminals can be exhausted for a period lasting from a few minutes to hours [28]. Subsequently, all the components of neurotransmission recover their initial values and the release of ACh returns to normal. Note that this situation is maintained for 24 hours. In terms of lifespan, 24 hours, in rodents, is a period comparable to ~30–40 days for humans [28]. The electric currents are effective even at situations of

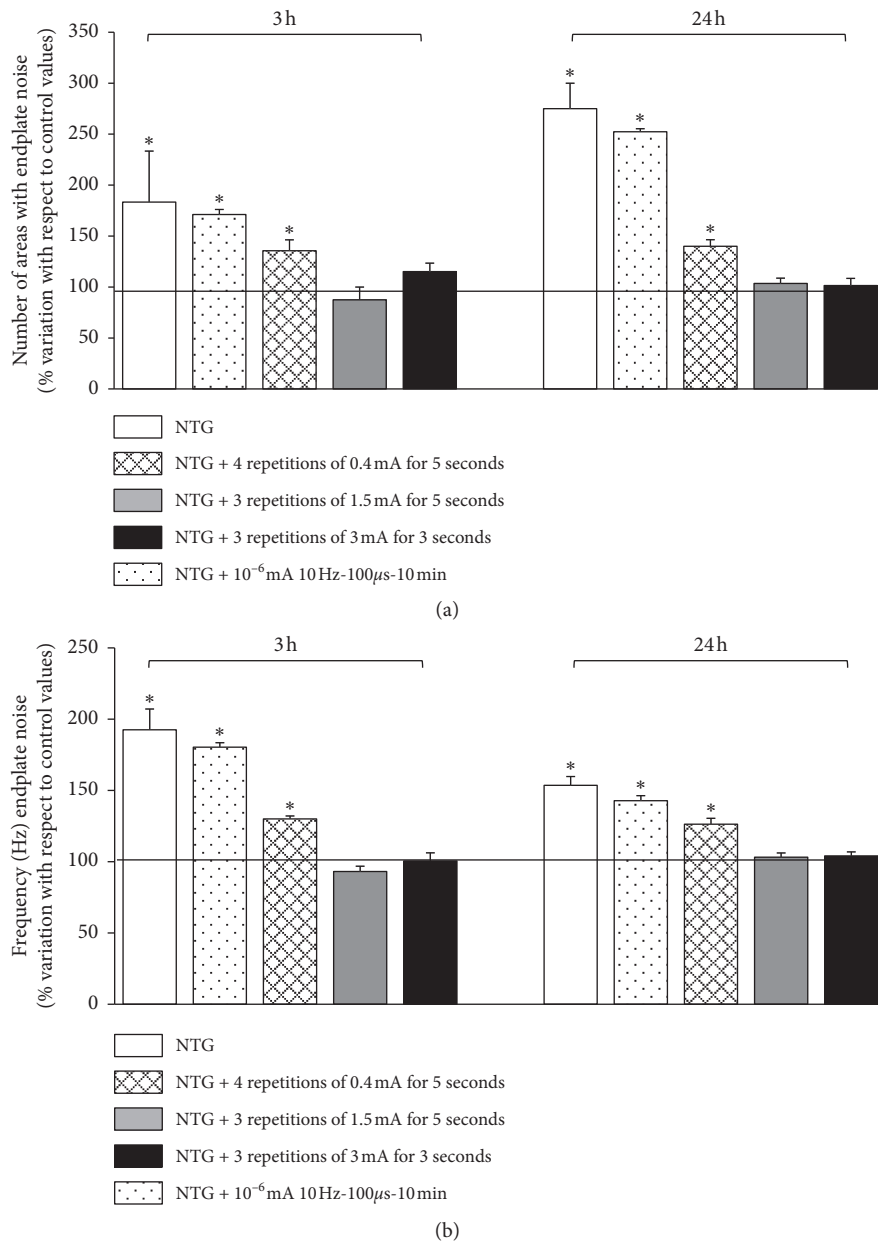


FIGURE 4: Electromyography. (a) Number of areas with endplate noise. (b) Endplate noise frequency. On the left, 3h after injection of neostigmine (NTG). On the right, 24 h after injection of neostigmine. Values are expressed in % of variation between experimental values registered in the right leg and control values registered in the left leg (mean \pm SEM). For each experimental series, $n = 5$ animals (5 control gastrocnemius and 5 gastrocnemius treated). * $P < 0.05$ with respect to control values.

long (24 hours) high neurotransmission induced by neostigmine, which may be associated with consolidated structural changes. The different degrees of effectiveness of the protocols used demonstrate that the intensity of the electric current is important in order to achieve clinical results. In this sense, protocol 3 (repetitions of 3 mA for three seconds) is shown to be the most effective in all the situations studied.

Glycosaminoglycans (GAGs) are macromolecules with a high hygroscopic capacity (to absorb and retain liquid and other substances) synthesized by fibroblasts [29]. Accumulations of GAGs in the MTrPs have been observed [4].

These GAGs can trap substances such as protons, SP, CGRP, bradykinin, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, 5-HT, and norepinephrine which have been found in the area of MTrPs [7]. These substances may be responsible for part of the clinical symptoms of MPS [7]. An LTR or a contraction of the whole muscle may compress the GAGs and release these substances to the vascular system and “wash out” the MTrP area. A visible contraction of part of the muscle after mechanical stimulation of an MTrP can occur (LTR) [10]. This mechanical stimulus can be produced either with a needle during DN or after the application of percutaneous electric currents. The LTR should not be confused with the abrupt

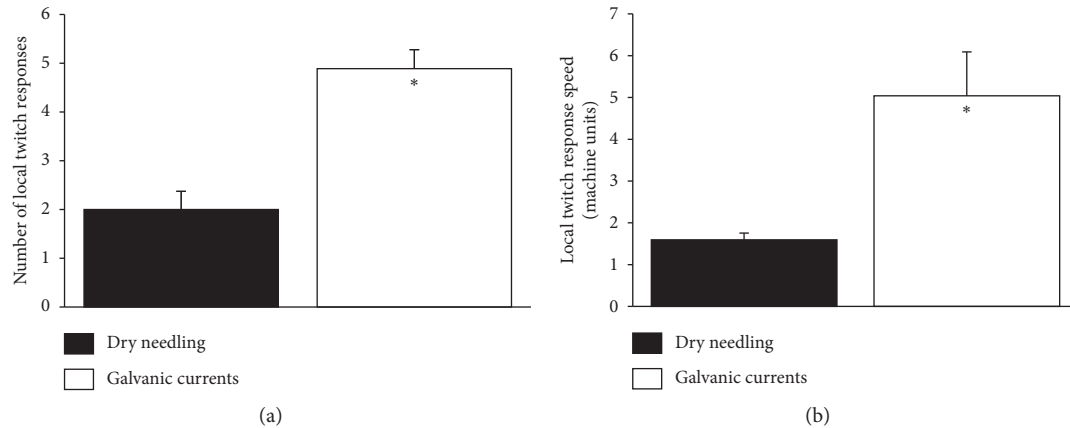


FIGURE 5: Ultrasonography. (a) Average number of local twitch responses obtained with dry needling and galvanic current. (b) Speed obtained for each local twitch response during the dry needling technique and after applying galvanic current. The values are expressed in machine units (mean \pm SEM). $N=6$ rats. * $P < 0.05$ for values obtained with galvanic current compared to values obtained using the dry needling technique.

contraction of the entire muscle by the application of percutaneous electric currents. When the needle is inserted into the muscle, the LTR is a sudden and highly localized movement produced into the muscle. When an electric current is applied, an immediate contraction of the muscle as a whole is obtained. Then, LTRs spontaneously appear. It is suggested that it is reasonable to associate the LTR with clinical improvement. Thus, the first authors to use ultrasound to identify, visualize, and quantify the number of LTRs caused during dry needling treatments in patients [30] reported that the group in which LTRs were elicited experienced a higher reduction of the pain compared to the group that did not show LTR. More recently, Koppenhaver et al. [31] conducted a study evaluating the relationship between LTR and pain, dysfunction, and nociceptive sensation with the functionality in the lower lumbar musculature. These authors concluded that the patients who experienced LTRs showed better improvement than the patients who did not. However, these improvements did not affect pain values. According to Koppenhaver and colleagues, the presence of LTRs during needling may be relevant; however, this is not indicative of successful treatment. If the presence of LTRs is clinically advantageous, a greater number of LTRs, with a greater power, is clinically relevant. However, there is no uniformity of criteria in reference to the clinical significance of the LTR. There are studies showing that there is a decrease in pain without evident LTR after treating with DN (see, for example, Hakim et al. [13]). Moreover, according to Perrault et al. [10], LTR during DN seems unnecessary to control myofascial pain and is not related to many of the positive effects of DN.

The effects of percutaneous electric currents may be further explained by other physiological phenomena, such as electrotaxis or galvanotaxis. These changes can cause a net movement of cells, such as endothelial cells [20], lymphocytes [32], or macrophages [33] towards the cathode. Moreover, endothelial electrotaxis is also involved in angiogenesis [20]. Inflammatory cells such as lymphocytes [32] or macrophages [33] migrate toward the cathode in

physiologically relevant electric fields. In the case of the muscle, the application of percutaneous electric currents in damaged muscle tissue can especially affect inflammatory mediators and influence the new vascularization of the injured area [21]. The angiogenesis and the electrotaxis of inflammatory cells may also be beneficial for treating MTrPs.

In summary, percutaneous electric currents, applied with sufficient intensity and power, offer several physiopathological explanations to support MTrPs: (1) the depletion of the synaptic vesicles caused by a massive depolarization of the axonal terminals, with a subsequent normalization of the neurotransmission; (2) LTR and the contraction of the entire muscle which may compress the GAGs and “wash out” the nociceptive substances; (3) electrotaxis or galvanotaxis of inflammatory cells and angiogenesis. These effects, at multiple neurochemical, electrical, and mechanical levels, provide new insights for novel therapeutic purposes.

5. Conclusion

A model of myofascial trigger points (MTrPs) is obtained when neostigmine is injected in mice. In a model of myofascial trigger points, the neuromuscular neurotransmission is increased. Using percutaneous electric currents, the action of neostigmine is reversed at both three and 24 hours. Moreover, the application of electric currents produced an increase in the number and in the speed of local twitch responses compared to dry needling. In conclusion, higher doses of electrical current are more effective for decreasing MTrPs findings in an animal model.

Data Availability

The (Figures 3, 4, and 5) data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors greatly appreciate the suggestions by Dr. M. T. Colomina regarding the drafting of this manuscript. The authors would like to thank PRIM Physio for supplying the Physio Invasiva® device to generate electric currents. This work was partially funded by a grant from the Commission for Universities and Research of the Department of Innovation, Universities and Enterprise of the Generalitat de Catalunya (MB, 2016 FI-B 00909).

Supplementary Materials

Supplemental videos: two videos showing muscular echography and several local twitch responses after treatment. DN: dry needling. GC: galvanic current. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] D. G. Simons, J. G. Travell, and L. S. Simons, *Myofascial Pain and Dysfunction: The Trigger Point Manual*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 1999.
- [2] W. P. Hanten, S. L. Olson, N. L. Butts, and A. L. Nowicki, "Effectiveness of a home program of ischemic pressure followed by sustained stretch for treatment of myofascial trigger points," *Physical Therapy*, vol. 80, pp. 997–1003, 2000.
- [3] M. S. Jafri, "Mechanisms of myofascial pain," *International scholarly research notices*, 2014.
- [4] R. Margalef, M. Sisquella, M. Bosque et al., "Experimental myofascial trigger point creation in rodents," *Journal of Applied Physiology*, vol. 126, pp. 160–169, 2019.
- [5] J. Kimura, J. Kimura, *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice*, in *Techniques to Assess Muscle Function*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2001.
- [6] D. G. Simons, C. Z. Hong, and L. S. Simons, "Endplate potentials are common to midfiber myofascial trigger points," *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, vol. 81, pp. 212–222, 2002.
- [7] J. P. Shah, T. M. Phillips, J. V. Danoff, and L. H. Gerber, "An in vivo microanalytical technique for measuring the local biochemical milieu of human skeletal muscle," *Journal of Applied Physiology*, vol. 99, pp. 1977–1984, 2005.
- [8] Y. T. Huang, S. Y. Lin, C. A. Neoh, K. Y. Wang, Y. H. Jean, and H. Y. Shi, "Dry needling formyofascial pain: prognostic factors," *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 17, pp. 755–762, 2011.
- [9] A. Domingo, O. Mayoral, S. Monterde, and M. M. Santafé, "Neuromuscular damage and repair after dry needling in mice," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 260806, 10 pages, 2013.
- [10] T. Perreault, J. Dunning, and R. Butts, "The local twitch response during trigger point dry needling: is it necessary for successful outcomes?" *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, vol. 21, pp. 940–947, 2017.
- [11] C. Z. Hong, "Lidocaine injection versus dry needling to myofascial trigger point. The importance of the local twitch response," *American Journal of Physical Medicine*, vol. 73, pp. 256–263, 1994.
- [12] L. Tekin, S. Akarsu, O. Durmus, E. Cakar, U. Dincer, and M. Z. Kiralp, "The effect of dry needling in the treatment of myofascial pain syndrome: a randomized double-blinded placebo-controlled trial," *Clinical Rheumatology*, vol. 32, pp. 309–315, 2013.
- [13] I. K. Hakim, I. E. Takamjani, J. Sarrafzadeh, K. Ezzati, and R. Bagheri, "The effect of dry needling on the active trigger point of upper trapezius muscle: eliciting local twitch response on long-term clinical outcomes," *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation*, vol. 32, no. 5, pp. 17–724, 2019.
- [14] A. Molsberger and C. D. McCaig, "Percutaneous direct current stimulation - a new electroceutical solution for severe neurological pain and soft tissue injuries," *Med Devices (Auckl)*, vol. 11, pp. 205–214, 2018.
- [15] F. Valera-Garrido, F. Minaya-Muñoz, and F. Medina-Mirapeix, "Ultrasound-guided percutaneous needle electrolysis in chronic lateral epicondylitis: short-term and long-term results," *Acupuncture Medicine*, vol. 32, pp. 446–454, 2014.
- [16] S. Hollis and P. McClure, "Percutaneous electrical stimulation for muscle activation of the tibialis anterior after surgical repair: a case report," *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, vol. 47, pp. 965–969, 2017.
- [17] P. Bursse, R. Forsyth, A. Steyaert, E. Van Ovest, M. Praet, and R. Verdonk, "Influence of burst TENS stimulation on collagen formation after Achilles tendon suture in man. a histological evaluation with Movat's pentachrome stain," *Acta Orthopaedica Belgica*, vol. 71, pp. 342–346, 2005.
- [18] J. Sroka, E. Zimolag, S. Lasota, W. Korohoda, and Z. Madeja, "Electrotaxis: cell directional movement in electric fields," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1749, pp. 325–340, 2018.
- [19] B. Cortese, I. E. Palamà, S. D'Amone, and G. Gigli, "Influence of electrotaxis on cell behaviour," *Integrative Biology*, vol. 6, pp. 817–830, 2014.
- [20] M. Papetti and I. M. Herman, "Mechanisms of normal and tumor derived angiogenesis," *American Journal of Physiology*, vol. 282, pp. C947–C970, 2002.
- [21] F. Abat, S. L. Valles, P. E. Gelber et al., "An experimental study of muscular injury repair in a mouse model of notexin-induced lesion with EPI® technique," *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*, vol. 7, p. 7, 2015.
- [22] M. L. Sandberg, "Blood flow changes in the trapezius muscle and overlying skin following transcutaneous electrical nerve stimulation," *Physical Therapy*, vol. 87, pp. 1047–1055, 2007.
- [23] J. E. Sherry, K. M. Oehrlein, K. S. Hegge, and B. J. Morgan, "Effect of burst-mode transcutaneous electrical nerve stimulation on peripheral vascular resistance," *Physical Therapy*, vol. 81, pp. 1183–1191, 2001.
- [24] F. Valera-Garrido and F. Minaya-Muñoz, *Fisioterapia Invasiva*, Elsevier España SL, Barcelona, Spain, 2nd edition, 2016.
- [25] E. M. McLachlan and A. R. Martin, "Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse," *The Journal of Physiology*, vol. 311, pp. 307–324, 1981.
- [26] D. G. Simons, "Review of enigmatic MTrPs as a common cause of enigmatic musculoskeletal pain and dysfunction," *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 14, pp. 95–107, 2004.
- [27] J. Del Castillo and B. Katz, "The membrane change produced by the neuromuscular transmitter," *The Journal of Physiology*, vol. 125, pp. 546–565, 1954.
- [28] B. Katz and R. Miledi, "Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer," *The Journal of Physiology*, vol. 203, pp. 689–706, 1969.
- [29] J. R. Fraser, T. C. Laurent, and U. B. Laurent, "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover," *Journal of Internal Medicine*, vol. 242, pp. 27–33, 1997.
- [30] D. W. 1 Rha, J. C. Shin, Y. K. Kim, J. H. Jung, Y. U. Kim, and S. C. Lee, "Detecting local twitch responses of myofascial

trigger points in the lower-back muscles using ultrasonography,” *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 92, pp. 1576–1580, 2011.

- [31] S. L. Koppenhaver, M. J. Walker, C Rettig et al., “The association between dry needling-induced twitch response and change in pain and muscle function in patients with low back pain: a quasi-experimental study,” *Physiotherapy*, vol. 103, pp. 131–137, 2017.
- [32] F. Lin, F. Baldessari, C. C Gyenge et al., “Lymphocyte electrotaxis in vitro and in vivo,” *Journal of Immunology*, vol. 181, pp. 2465–2471, 2008.
- [33] Y. S. Sun, S. W. Peng, and J. Y. Cheng, “In vitro electrical-stimulated wound-healing chip for studying electric field-assisted wound-healing process,” *Biomicrofluidics*, vol. 6, p. 34117, 2012.

**4.3. ARTICULO 3 SAFETY ANALYSIS OF PERCUTANEOUS NEEDLE
ELECTROLYSIS: A STUDY OF NEEDLE COMPOSITION, MORPHOLOGY,
AND ELECTRICAL RESISTANCE.**

4.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ARTÍCULO 3. SAFETY ANALYSIS OF PERCUTANEOUS NEEDLE ELECTROLYSIS: A STUDY OF NEEDLE COMPOSITION, MORPHOLOGY, AND ELECTRICAL RESISTANCE.

1. Evaluar los cambios en la resistencia eléctrica de las agujas utilizadas para vehicular las CG en el tejido tratado.
2. Estudiar los posibles cambios de temperatura inducidos por la aplicación de la CG.
3. Describir los cambios en la morfología y la composición de los elementos que componen las agujas utilizadas en el tratamiento de corriente galvánica intramuscular.

4.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS ESPECÍFICOS DEL ARTÍCULO 3.

4.3.2.1. Resistencia eléctrica

El estudio se realizó con agujas Physio Invasiva® 0.30 mm de grosor y 40 mm de longitud. La resistencia se evaluó con un Multi voltímetro Digital Velleman DVM92.

Se evaluaron 20 agujas seleccionadas de forma aleatoria. A cada una de ellas se le aplicó EPM después de insertarla a un ratón anestesiado e inmobilizado en decúbito prono. Previa depilación de la zona de inserción posterior y lateral de las patas posteriores, se insertó una aguja en el gastrocnemio derecho (estímulo) y otra en el izquierdo (control; ver figura 1 del artículo 3). Los experimentos se realizaron insertando agujas en el músculo gastrocnemio del ratón. Luego se aplicaron corrientes eléctricas. Después de retirar las agujas, las dos partes fueron diferenciadas: la insertada en el animal y la no insertada. Las partes insertadas y no insertadas fueron evaluadas por: resistencia eléctrica y microanálisis de la composición del metal. Los parámetros de la aplicación fueron: 3mA durante 3 segundos y 3 aplicaciones (3:3:3) con 1 minuto de descanso entre ellas. Como se puede ver la figura 1 del artículo 3, el cátodo se insertó en el gastrocnemio la pierna derecha del ratón, el ánodo se insertó por vía subcutánea en la espalda del mismo animal. Se insertó una aguja adicional en la pierna izquierda para actuar como control (sin recibir CG).

De cada aguja se evaluó la resistencia de la porción proximal (no insertada) y distal (insertada) y se calculó el % de variación entre los dos valores.

4.3.2.2. Temperatura.

El estudio se realizó con agujas Physio Invasiva® de 0,35 de grosor y 100 mm de longitud. La temperatura se evaluó con el Digital Thermometer TMP 812 (Letica, Barcelona, Spain).

Se eligieron 5 agujas aleatoriamente para cada serie experimental. Cada una se introdujo en los tubos de ensayo (ver figura 2 del artículo 3) que contenían la solución fisiológica de Ringer (composición en milimolar (mM): NaCl 135, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 15, glucosa 11. La temperatura se determinó in vitro. Se controló la temperatura y la humedad relativa de la habitación donde se llevaron a cabo estos experimentos. Como se puede ver en la figura 2 del artículo 3, el ánodo y el cátodo se insertaron en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de solución salina de Ringer y se instaló un sensor de temperatura digital. Luego se aplicó un protocolo de corrientes eléctricas y se registró la temperatura máxima. Este procedimiento se repitió en cinco tubos de ensayo para cada protocolo estudiado. Las agujas del ánodo y del cátodo se insertaron en los tubos de ensayo en una gradilla de laboratorio, sumergidas en la solución de Ringer, separados entre sí y conectados al generador de corriente galvánica. Los protocolos utilizados fueron:

3mA durante 3 segundos y 3 aplicaciones (3:3:3); 3mA durante 60 segundos y 3 aplicaciones (3:60:3) y 3mA durante 60 segundos y 7 aplicaciones (3:60:7). En todos los protocolos se dejó 1 minuto entre aplicaciones. Se determinó la temperatura antes y después de la aplicación de las corrientes eléctricas. Los resultados obtenidos se expresaron como % de variación entre esos dos valores.


4.3.2.3. Microscopía electrónica de barrido y microanálisis

Se analizaron agujas de 0.30mm de grosor y 40mm de longitud (Physio Invasiva®). Las agujas estudiadas fueron elegidas de forma aleatoria entre diferentes lotes de producto.

Los protocolos utilizados fueron: Protocolo 1, 3mA durante 3 segundos y 3 aplicaciones (3:3:3), se han estudiado agujas Physio Invasiva® procedentes del Centro BRUMA-Tarragona (6 agujas) y del Centro MVClinic-Madrid (9 agujas) en humanos y del Laboratorio UHN (10 agujas) en animales; Protocolo 2, 3mA durante 3 segundos y 10 aplicaciones (3:3:10), se evaluaron 5 agujas usadas en animales; Protocolo 3, 3mA durante 3 segundos 50 aplicaciones (3:3:50), se evaluaron 5 agujas usadas en animales.

Las agujas fueron analizadas con el microscopio electrónico de barrido, FEI Quanta 600 con un equipo de microanálisis por difusión de RX Oxford Instruments, Inc. del Servicio Científico Técnico de la Universidad Rovira i Virgili. La magnificación de trabajo fue de 2000X. De cada aguja se estudió su morfología y se realizó microanálisis. Los resultados del microanálisis se expresaron por cada metal comparando la punta, insertada en el tejido, respecto a la zona cercana al mango, que permanecía externa.

Safety analysis of percutaneous needle electrolysis: a study of needle composition, morphology, and electrical resistance

Acupuncture in Medicine
1–7
DOI: 10.1177/0964528420988007
© The Author(s) 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
journals.sagepub.com/home/aim


Ramón Margalef¹, Marc Bosque¹, Francisco Minaya-Muñoz^{2,3},
Fermín Valera-Garrido^{2,3,4} and Manel M Santafe¹ 

Abstract

Background: Percutaneous needle electrolysis (PNE) consists of a galvanic current combined with the insertion of a solid needle into the tissues of the musculoskeletal system. The application of a galvanic current through a needle can alter the morphology and composition during treatment application. This procedure may also provoke a localized temperature increase.

Aim: The aim was to evaluate the safety of the PNE procedure by analyzing possible alterations of the needles employed.

Methods: Physio Invasiva[®] and AguPunt EPI[®] brand needles, commonly used for the application of this technique, were analyzed in response to three different treatment protocols. Temperature changes were evaluated with the needles immersed in a test tube containing Ringer's solution, and electrical resistance was evaluated with a multimeter. The morphology of the needles, pre- and post-treatment, was examined with a scanning electron microscope (FEI Quanta 600), and the composition of the needles was evaluated using RX diffusion with Oxford Instruments software.

Results: Ringer's solution contained in the test tubes examined did not present temperature changes. No changes were observed in the needles under investigation with respect to electrical resistance, morphology, or composition with a protocol applying 3-mA intensity for 3 s and three applications. However, important morphological alterations were observed that affected needle composition after 50 applications (at 3 mA for 3 s).

Conclusion: PNE, applied according to conventional protocols, appeared to be safe and athermal, and did not provoke a loss of metal particles or modify the morphology of the needles used when studied in vitro.

Keywords

electrical resistance, electrolytic ablation, percutaneous needle electrolysis, solid needles

Accepted: 12 December 2020

Introduction

Percutaneous needle electrolysis (PNE) is an invasive physical therapy technique that consists of the application of a galvanic current through an acupuncture needle. This technique produces an analgesic effect on the musculoskeletal soft tissue, triggering a local inflammatory process, which enables phagocytosis and the repair of the affected tissue.¹

In surgery, galvanic currents are used for “electrolytic ablation.” This procedure draws upon an important increase in temperature to perform surgical resections, together with

¹Unit of Histology and Neurobiology, Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

²MVClinic Institute, Madrid, Spain

³Department of Physical Therapy, CEU San Pablo University, Madrid, Spain

⁴Getafe CF, Madrid, Spain

Corresponding author:

Manel M Santafe, Unit of Histology and Neurobiology, Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University, carrer St Llorenç num. 21, 43201 Reus, Spain.
Email: manuel.santafe@urv.es

cauterization, using a high amperage and duration.^{2,3} Current protocols for PNE use lower intensities and are considered athermic.⁴ However, this hypothesis has not been confirmed. The increase in local temperature found in a small caliber needle could potentially place the integrity of the tissue at risk.

In addition, the study of the elements that comprise the acupuncture needle, as well as the effects of galvanic currents on these needles during their therapeutic use, has received greater attention as the popularity of these treatments has increased. Several studies have reported the clinical use of needles with manufacturing malformations. For example, Hayhoe et al.⁵ described important alterations affecting the tips of acupuncture needles. More recently, Xie et al.⁶ conducted a study that highlighted the deformed appearance of acupuncture needle tips using an electron microscope, prior to their use. In direct relation to the use of galvanic currents, Hwang et al.⁷ described the major corrosion of needles used during the application of currents plus an accumulation of metallic components in the tissue treated. This would imply that the repeated use of a galvanic current in certain areas could leave undesirable metallic residue with unknown consequences. Moreover, a loss of needle substance could decrease the needle diameter, thus increasing resistance and generating heat. In recent years, needle quality and design have notably improved; however, no study has reevaluated the needles that are used clinically.

The aim of the present study was to evaluate the safety of PNE based on the analysis of an animal and human model of electrical resistance, measuring temperature changes and the morphology of the needles used during the procedure.

Methods

Description of the sample

Needles used on humans were obtained post-treatment from the MVClinic in Madrid and the BRUMA Clinic in Tarragona (Spain).

A study on animals was performed at the Unit of Histology and Neurobiology (UHN) of the Faculty of Medicine and Health Sciences of Rovira i Virgili University in Reus, Spain. Experiments were performed in 35 adult young male Swiss mice of 45- to 50-day postnatal age (Charles River, L'Arbresle, France). The mice were treated according to the regulations established by the Directive of the Council of the European Community in November 1986 (86/609/EEC) for the manipulation of laboratory animals. These mice were anesthetized with 0.7 mL of intraperitoneal tribromoethanol (TBE 2%: 2-g tribromoethanol in 100 mL of distilled water). To confirm that the mouse was sedated, ocular and plantar reflexes were assessed.

Possible alterations of needles were examined after the application of PNE based on the most common clinical

treatment protocols, as described by Valera-Garrido and Minaya-Muñoz,⁴ together with the application of more extreme parameters, in an attempt to fully test the needle integrity. The parameters analyzed were intensity, time (in seconds), and the number of repetitions. These were described by three numerical values in the same order (e.g. 3 mA for 3 s and three repetitions, i.e. 3:3:3).⁴

The device used to generate the galvanic current percutaneously in all experiments was Physio Invasiva® CE0120 (PRIM Physio, Spain). The needles used were of the Physio Invasiva® and AguPunt EPI® brands.

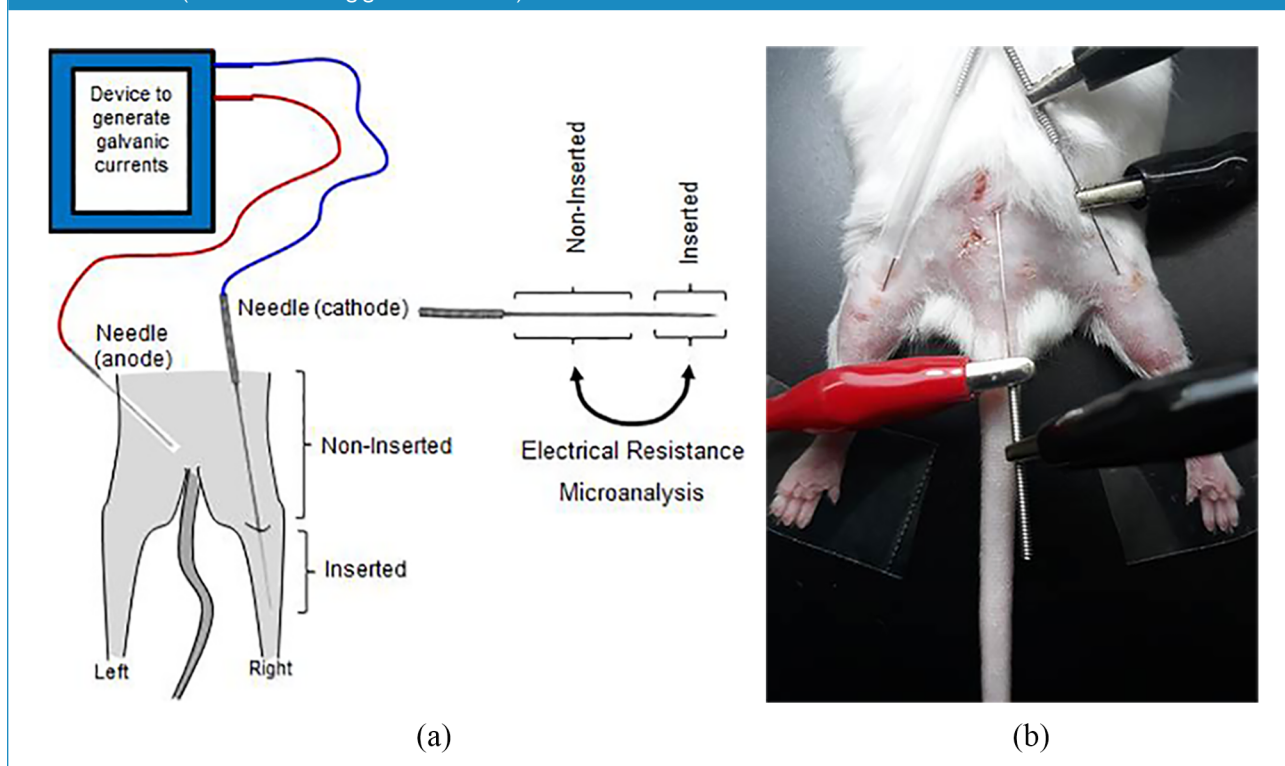
Electrical resistance

The study was performed using Physio Invasiva® needles (141002 and 160101) and AguPunt EPI® needles (181106 and 180927) measuring 0.30 mm in width and 40 mm in length. The resistance was evaluated with a Velleman DVM92 Digital Multi Voltmeter (Velleman NV, Gavere, Belgium). Twenty needles were randomly selected, and PNE was performed with the immobilized anesthetized mouse placed in a prone position. After removing hair from both the posterior and the lateral insertion area of the rear limbs, a needle was inserted into the right gastrocnemius (stimulus) and the left gastrocnemius (control) (Figure 1). The application parameters were 3:3:3 with a 1-min rest period in between. For each needle, the resistance of the proximal (non-inserted) portion was evaluated together with the distal (inserted) portion and the percentage variation between the data was calculated (Figure 1(a)).

Temperature

This study was performed using Physio Invasiva® needles measuring 0.35 mm in diameter and 100 mm in length (181123 and 170512) immersed in Ringer's saline solution (composition in millimolar: NaCl 135, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 15, glucose 11). Temperature was evaluated using a TMP 812 digital thermometer (Letica, Barcelona, Spain). The temperature and relative humidity of the room where these experiments were carried out were controlled at 26°C and 50%, respectively. The anode needle and the cathode needle were inserted into a test tube containing 10 mL of Ringer's saline solution (Figure 2), into which the digital temperature sensor was also introduced. Then a protocol of electrical currents was applied and the maximum temperature obtained was recorded. This procedure was repeated in five test tubes for each protocol studied. Five anode needles were randomly selected for each experimental series. The protocols employed were 3 mA for 3 s and three applications (3:3:3), 3 mA for 60 s and three applications (3:60:3), and 3 mA for 60 s and seven applications (3:60:7). During all protocols, a 1-min rest period was observed between applications.

Figure 1. Application of percutaneous needle electrolysis (PNE) in the mouse. (a) Experiments were done by inserting needles into the mouse gastrocnemius muscle. Then electric currents were applied. After removing the needles, two parts were obtained: one that had been inserted into the animal and the other non-inserted. The inserted and non-inserted parts were evaluated: electrical resistance and microanalysis of the metal composition. (b) Photograph showing how needles were inserted into mice to apply electric currents. (1) The cathode was inserted into the posterior muscle bundle of the mouse's right leg. (2) The anode was inserted subcutaneously at the back of the same animal. (3). An additional needle was inserted into the left leg to act as a control (without receiving galvanic current).



Scanning electron microscopy and microanalysis

Needles of 0.30mm in diameter and 40mm in length were used (Physio Invasiva[®] and AguPunt EPI[®]). The needles studied were randomly selected from different product batches (Physio Invasiva[®] 141002, 160101, and 180722; AguPunt EPI[®] 181106 and 180927). The protocol of electrical currents used in patients was the usual one at the clinics that provided the needles. Each needle belonged to a different patient treated with electrical current. To determine that the protocols commonly used in patients are safe and far from those that are dangerous, first, we repeated that protocol in mice (Figure 1) and then we increased the number of applications until obtaining the loss of metals, which was detected by microanalysis. The protocols used were as follows:

- Protocol 1: 3mA for 3s and three applications (3:3:3). We studied Physio Invasiva[®] needles used in human patients (from the BRUMA Clinic in Tarragona (6 needles) and from MVClinic in Madrid (9 needles)) and from the UHN laboratory (10 needles) after their use in animals.

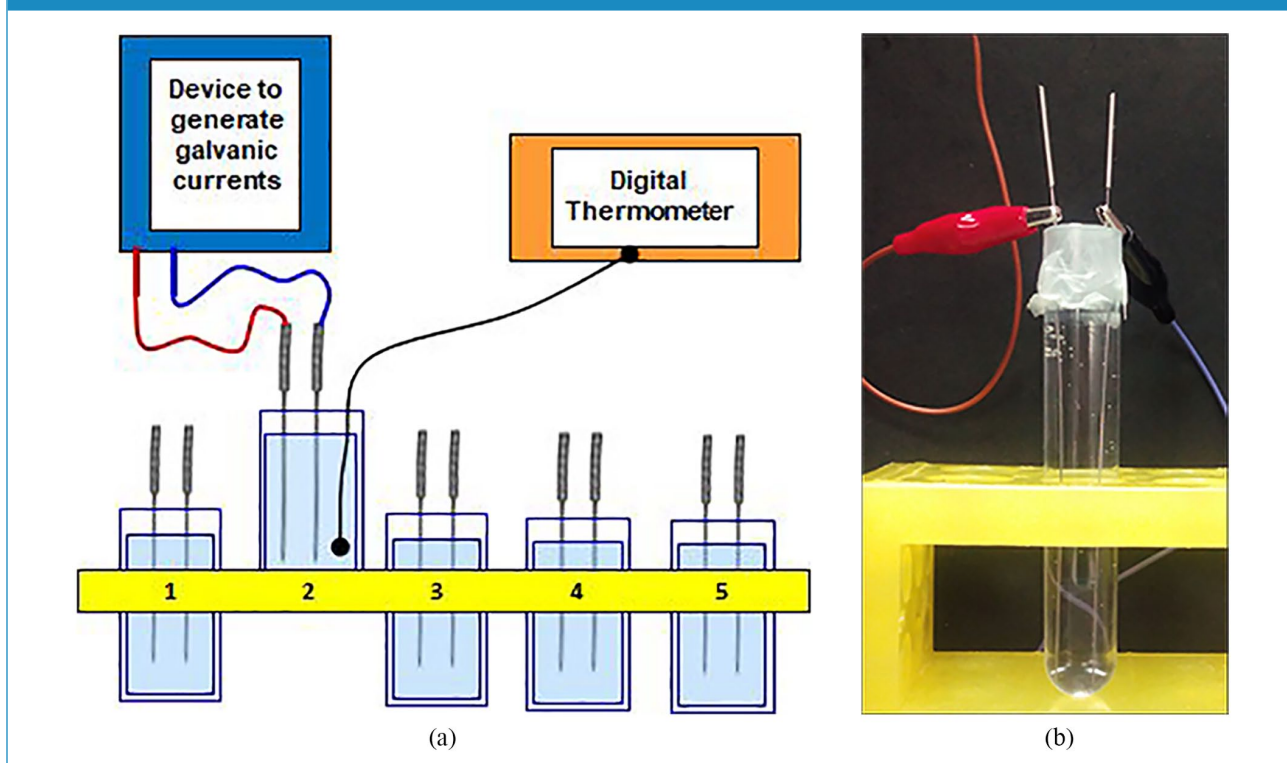
- Protocol 2: 3 mA for 3 s and 10 applications (3:3:10). Five needles were evaluated in animals.
- Protocol 3: 3 mA for 3 s and 50 applications (3:3:50). Five needles were evaluated in animals.

The scanning electron microscope used was FEI Quanta 600 with a microanalysis device by RX diffusion (Oxford Instruments software) of the Technical Scientific Service of the Rovira i Virgili University. The magnification settings were 2000 \times .

For each needle, the morphology was studied and microanalysis was performed comparing the tip (which had been inserted into the tissue) with the area close to the handle (which had remained external).

The needles studied had been used during the treatment of the gastrocnemius muscles of humans and mice. The application of the galvanic current in humans was performed by inserting the cathode (needle) within the muscle tissue to be treated, whereas the anode remained external and was held in the hand of the patient. In the case of the study in mice, the cathode was inserted inside the muscle bundle behind the right leg of the mouse (1 cm) and the anode was inserted subcutaneously into the mouse's back

Figure 2. Temperature study in response to percutaneous needle electrolysis (PNE). (a) Temperature was determined in vitro. The temperature and relative humidity of the room where these experiments were carried out were controlled. The anode and cathode needles were inserted into a test tube containing 10-mL Ringer's saline solution, and a digital temperature sensor was introduced into the same test tube. Then a protocol of electric currents was applied and the maximum temperature obtained was recorded. This procedure was repeated in five test tubes for each protocol studied. (b) Photograph showing how in vitro electric currents were applied. The anode and cathode needles were inserted into the test tubes in a laboratory rack, immersed in Ringer's solution, separated from each other and connected to the galvanic current generator.



(Figure 1(a)). In addition, a control needle was inserted into the left leg (not receiving galvanic current).

Statistical analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to analyze the results. The values were expressed as the mean \pm standard deviation. To evaluate differences within groups, Student's t test was used. The differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Electrical resistance

Twenty needles were evaluated with the 3:3:3 protocol. For each needle, the resistance of the distal portion, which was inserted into the animal, was determined, and the resistance of the proximal portion was assessed as a control. No change in the proximal-distal resistance was observed (% of mean variance: Physio Invasiva®, 0.40 ± 3.33 ; AguPunt EPI®, 0.16 ± 0.01 ; $P > 0.05$ in both cases). Therefore, the

Table 1. Temperature study in vitro after three different electrical current protocols.

Protocol ^a	Before	After
3:03:3	26.11 ± 0.40	26.21 ± 0.10
3:60:3	25.62 ± 0.43	25.62 ± 0.43
3:60:7	25.33 ± 0.25	25.33 ± 0.26

The values of the temperature expressed in °C before and after applying different electric current protocols used for percutaneous needle electrolysis are shown. The needles were inserted into the test tubes in a laboratory rack, separated from each other and connected to the device (see Figures 1(b) and 2(b)). The results are expressed as mean \pm standard deviation.

^aProtocol (intensity:time in seconds:number of repetitions).

use of the galvanic current employed in PNE did not appear to alter the electrical properties of the needle.

Temperature

Five needles were evaluated, in five different test tubes for each protocol. Table 1 shows the values of the temperature

expressed in °C before and after applying different electrical current protocols. In protocol 3:3:3, no temperature variance was observed (% of mean variance: 0.4 ± 1.2 , $P > 0.05$). Neither was any variance observed applying 3:60:3 (% of mean variance: 0.0 ± 0.0 , $P > 0.05$). In addition, in the most aggressive protocol, 3:60:7, no temperature variance was observed (% of mean variance: 0.0 ± 0.1 , $P > 0.05$).

Morphology and composition of needles after use

A study of the morphology of the needles exposed to the galvanic current in human muscle tissue and in mice revealed the following: with protocol 3:3:3 (protocol 1), no relevant structural changes were observed in any of the needles studied. Figure 3 displays examples showing how the needle tips (part exposed to the muscle tissue; Figures 3(a) and (b)) do not show any ultrastructural changes. The impurities that can be observed on the surface are cells and metal shavings from manufacturing, as observed in a previous study.⁸ Figures 3(c) and (d) correspond to the protocol 3 mA for 3 s and 10 applications, displaying similar results with those obtained in protocol 1, despite the greater number of repetitions. As no alteration was obtained, an excessive protocol of 50 repetitions was applied in protocol 3 (3 mA for 3 s and 50 applications), in which an alteration of the needle morphology was observed, presenting erosions and cavities (Figures 3(e) and (f)). These changes were found in both brands of needles tested.

The metal composition of the needles was evaluated using microanalysis. The most common metals used were chromium, iron, nickel, and manganese. To rule out the possibility of the metal from the needles remaining and becoming attached to the treated tissues, the quantity of the metals present in the inserted part of the needle was measured and compared with the external part of the needle. Table 2 shows that there was no loss of any of the metals in the needles exposed to protocol 3:3:3. However, in Physio Invasiva[®] needles exposed to 10 repetitions of 3 mA for 3 s, a non-significant loss of iron and nickel was observed. By increasing the repetitions of 3 mA currents up to 50 for 3 s, statistically significant losses of all metals were obtained for both brands of needles tested.

Discussion

This study has examined the needles used in clinical practice for the application of galvanic currents using the technique known as PNE.⁴ To our knowledge, this is the first study to analyze the safety of the application of PNE based on the analysis of the needles used in the technique.

Historically, galvanic currents have been used in surgery to provoke thermal ablation. Thus, for example, in

pioneering studies based on electrolytic ablation of hepatic tumors, not only is the surgical action described but reports have also focused on the beneficial actions related to the revascularization of the hepatic tissue or the ability to influence the inflammatory reaction.^{2,3} The thermal cauterizing action of these treatments requires a very high amperage (60–80 mA), which is also prolonged over extremely long periods of time (20–35 min). It is important to note that, in this study, the parameters were very low, both regarding amperage (approximately 2500 times lower than those of other authors, as reported by Finch et al.³) as well as the periods of time of continuous application (approximately 3000 times lower than those of other authors, as reported by Wemyss-Holden et al.²). These justify the observation that treatment with galvanic current has been entirely athermal in an *in vitro* test. The examination of the change in resistance of the needles due to the application of a galvanic current indicated a null variation between the inserted portion and the non-inserted or external portion of the needle. This explains the lack of temperature change and, according to the Ohm behavior or the resistance of the materials, an increased resistance implies a near-proportional increase in temperature.⁹

In the scientific literature available on this subject, several studies have described the existence of needles with manufacturing defects. For example, Hayhoe et al.⁵ and Xie et al.⁶ described a wide variety of alterations in the tips of acupuncture needles before use of the same. In the present study, no manufacturing imperfections were observed on any of the needles. This finding was recently reported elsewhere:⁸ the manufacturers of needles have notably improved the quality of the same in recent years. Hwang et al. evaluated needles post-treatment with electrical currents and found considerable corrosion of the needles after their use.⁷ The same study also demonstrated the accumulation of metallic substances in a gelatin model used to practice acupuncture techniques. These authors used two protocols, one of 2 Hz at 0.05 mA, and another of 10 Hz at 1 mA; both were used over a notably long time period (30 min). Similarly, Lee et al.,¹⁰ using another type of needle, also found deterioration of the surface of needles. It seems obvious that the 3 mA of the present study, with a far shorter duration of stimulus, does not generate any variation, neither structural nor in loss of materials. In contrast, when the 3 mA for 3 s protocol is repeated a notably higher number of times, this produces important structural alterations. Apparently, the loss of metals visible on electronic microscopy should be greater in the study of microanalysis using this latter protocol. The microanalysis performed by scanning electron microscopy shows the proportion of metals on the surface of the needles. Thus, the loss observed in this last protocol indicates that all the metals remained within the tissues of the mouse to a similar degree, regardless of the brand of needle used.

Figure 3. Examples of needles used in different percutaneous needle electrolysis (PNE) protocols. Two types of needles were tested: *Physio Invasiva*[®] (panels a, c, and e) and *AguPunt EPI*[®] (panels b, d, and f). The protocols used were 3 mA for 3 s with 3 repetitions (panels a and b), 10 repetitions (panels c and d), and 50 repetitions (panels e and f). Note that only in the situation of repeating the application 50 times was an alteration in the morphology of the needle tip obtained. Initial magnification is 200 \times .

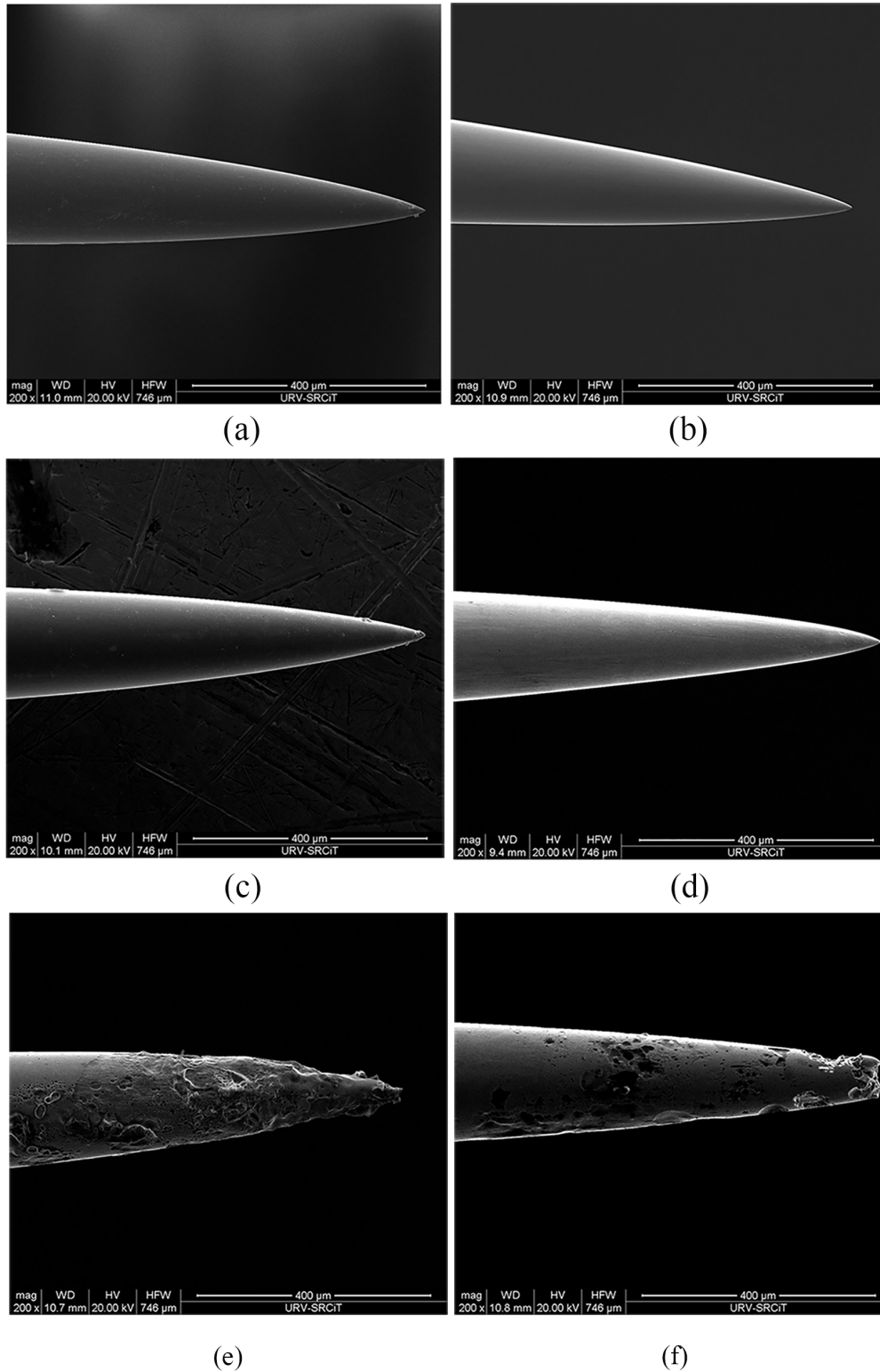


Table 2. Analysis of needle composition.

Protocol ^a	Origin of needles	Brand of needles	Cr	Fe	Ni	Mn
3:03:03	Patients	Physio Invasiva [®]	1.1 ± 1.7	1.0 ± 1.6	2.1 ± 1.9	5.3 ± 7.7
3:03:03	Mice	Physio Invasiva [®]	2.5 ± 1.0	2.8 ± 1.5	1.4 ± 1.5	0.0 ± 0.0
		AguPunt EPI [®]	4.6 ± 1.5	2.8 ± 1.1	5.7 ± 1.4	3.9 ± 1.6
3:03:10	Mice	Physio Invasiva [®]	2.1 ± 2.1	5.8 ± 1.8	17.5 ± 7.2	11.9 ± 10.1
		AguPunt EPI [®]	6.1 ± 1.5	6.1 ± 1.3	4.0 ± 2.6	2.1 ± 0.1
3:03:50	Mice	Physio Invasiva [®]	19.3 ± 1.1*	13.5 ± 0.8*	16.5 ± 2.0*	0.0 ± 0.0
		AguPunt EPI [®]	18.8 ± 0.4*	16.4 ± 1.5*	22.3 ± 1.4*	2.03 ± 1.8

Cr: chrome; Fe: iron; Ni: nickel; Mn: manganese.

The results show the percent variation between the portions inserted into the biological tissues and the most distal, non-inserted area (see Figures 1(a) and 2(a)). The needles used in patients were provided by the centers MVClinic in Madrid and BRUMA Clinic in Tarragona. Each needle belongs to a different patient treated with electrical currents. The results are expressed as mean ± standard deviation.

^aProtocol (intensity:time in seconds:number of repetitions).

*P < 0.05.

Conclusions

PNE applied according to conventional protocols appears to be a safe procedure. The use of galvanic current does not produce local thermal alteration in an in vitro test, nor does it alter the electric properties of the needle, which do demonstrate loss of metals or modification of their morphology during use. However, if the parameters are abusive, an alteration of the needle is possible and there is potential for risk occurring.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Mariana Stankova, from the Service of Scientific and Technical Resources of the Rovira i Virgili University (URV) for her crucial technical guidance regarding the scanning electron microscope. Furthermore, we are grateful to PRIM Physio, who generously provided the needles and the Physio Invasiva[®] device for the generation of the galvanic currents used in this study. Special thanks also to the BRUMA Clinic in Tarragona for kindly providing some of the needles used in their daily practice.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID iD

Manel M Santafe  <https://orcid.org/0000-0002-5462-5108>

References

- Valera-Garrido F, Minaya-Muñoz F and Medina-Mirapeix F. Ultrasound-guided percutaneous needle electrolysis in chronic lateral epicondylitis: short-term and long-term results. *Acupunct Med* 2014; 32(6): 446–454.
- Wemyss-Holden SA, Berry DP, Robertson GSM, et al. Electrolytic ablation as an adjunct to liver resection: safety and efficacy in patients. *ANZ J Surg* 2002; 72(8): 589–593.
- Finch JG, Fosh B, Anthony A, et al. Liver electrolysis: pH can reliably monitor the extent of hepatic ablation in pigs. *Clin Sci* 2002; 102(4): 389–395.
- Valera-Garrido F and Minaya-Muñoz F. *Fisioterapia invasiva*. 2nd ed. Barcelona: Elsevier España, 2016.
- Hayhoe S, McCrossan M, Smith A, et al. Single-use acupuncture needles: scanning electron-microscopy of needle-tips. *Acupunct Med* 2002; 20(1): 11–18.
- Xie YM, Xu S, Zhang CS, et al. Examination of surface conditions and other physical properties of commonly used stainless steel acupuncture needles. *Acupunct Med* 2014; 32(2): 146–154.
- Hwang HS, Yang EJ, Ryu YH, et al. Electrochemical corrosion of STS304 acupuncture needles by electrical stimulation. *J Acupunct Meridian Stud* 2010; 3: 89–94.
- Bosque M, Rhys-Jones L, Poveda-Pagán E, et al. Alterations of the needle tips in the dry needling technique. *Rev Fisioter Invasiva* 2016; 1: 26–34.
- Serway RA and Jewett JW. *Physics for scientists and engineers*. 9th ed. Boston, MA: Cengage Learning Custom Publishing, 2014.
- Lee S, Choi GH, Lee CH, et al. Exploration of new electroacupuncture needle material. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 612545–612510.

5. DISCUSIÓN GENERAL

En la presente tesis se ha creado un modelo animal (artículo 1) para poder testar un tratamiento de corrientes galvánicas intramusculares (artículo 2) y evaluar si este tratamiento puede tener algún componente nocivo para los pacientes (artículo 3).

Los resultados obtenidos con las técnicas electrofisiológicas de registro intracelular y electromiográfico han evidenciado que la administración de una dosis única subcutánea de neostigmina (NTG) provoca un aumento de la liberación espontánea de ACh en las uniones neuromusculares, traduciéndose en un aumento en la frecuencia de los potenciales de placa en miniatura (MEEPs) y del ruido de placa. Este aumento está relacionado con la aparición de sarcómeros contracturados adoptando una conformación nodular. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha confirmado que esos nódulos están efectivamente situados debajo de los contactos sinápticos. También se ha observado, mediante técnicas histológicas, que en las zonas donde han aparecido estos nódulos contracturados, se produce un aumento de la presencia de glucosaminoglicanos (GAGs). La presencia conjunta de estos nódulos contracturados y los GAGs permitirían explicar las sensaciones palpatorias descritas durante la exploración de músculos de personas con PGM. Hay que comentar, que en el presente modelo animal, no se ha podido palpar el nódulo hiperirritable descrito en los criterios clínicos de diagnóstico de PGM en humanos y que el paciente reconoce como origen del dolor, pero si se han identificado, mediante exploración manual realizada por fisioterapeutas expertos en el tratamiento de los PGM, la presencia de bandas tensas palpables que cuando son estimuladas presentan respuestas de espasmo locales (RELS) y que han sido registradas ecográficamente por primera vez en animales.

Con el modelo de PGM, se obtuvo que el protocolo 3/3/3, revirtió por completo la alta neurotransmisión espontánea (MEPPs) lograda con una inyección subcutánea de NTG. La frecuencia de MEPP retornó a los valores normales a las 3 horas y se mantuvo durante las siguientes 24 horas. En los registros electromiográficos tanto el protocolo 3/3/3, como 1.5/5/3 disminuyeron los valores altos tanto del número de áreas con ruido de placa terminal como de la frecuencia del ruido de placa terminal. Aunque, todos los protocolos testados fueron efectivos en diferente grado, solo el protocolo de 3/3/3 (3 repeticiones de 3 mA durante 3 segundos) revirtió por completo todos los parámetros estudiados en todas las situaciones. Por otro lado, se ha observado que las RELs provocadas por las corrientes eléctricas con respecto a las producidas por punción seca fueron más numerosas y con mayor velocidad. El conjunto estos datos apuntan a que la aplicación de corriente galvánica intramuscular puede ser muy ventajosa en el tratamiento de PGM en pacientes. Sin embargo, es preciso un ensayo clínico que estudie y valore su uso en humanos.

El conjunto de pruebas para evaluar el grado de seguridad de la técnica de CGI aplicada por agujas sólidas mostró que los usos de las corrientes no generan ningún incremento térmico local. En consecuencia, no pueden provocar quemaduras. Por otro lado,

tampoco se alteran las propiedades eléctricas de la aguja durante su uso ni pierden metales, ni modifican su morfología. No obstante, si los parámetros resultan abusivos es posible una alteración de la morfología en la parte insertada de la aguja con transferencia de metales a los tejidos, por tanto, un riesgo potencial para el paciente.

5.1. AUMENTO DE LOS MEEPS POR ACCIÓN DE LA NEOSTIGMINA.

Aunque no existen trabajos previos que evalúen la actividad eléctrica intracelular de las SNMs de fibras musculares con PGM, si existen trabajos que evalúan los cambios electrofisiológicos y morfológicos por la administración de fármacos anticolinesterásicos como la neostigmina (NTG)⁵⁵⁻⁵⁹. Los trabajos de Tiedt y colaboradores⁵⁶ junto con el equipo de Hudson⁵⁵ publicados ambos en 1978, evaluaron las alteraciones electrofisiológicas y estructurales que induce la NTG sobre las uniones neuromusculares, para conocer los posibles efectos adversos asociados al uso de este fármaco durante el tratamiento de pacientes con *miastenia gravis*. En estos trabajos, 30 minutos después de la administración de una dosis de NTG, registraron un incremento de la frecuencia de los MEEPs espontáneos, así como de la amplitud y el tiempo de caída. Sin embargo, cuando el tratamiento fue repetido a las 12 y 36 horas, estos parámetros disminuyeron. Hudson y colaboradores⁵⁵ relacionaron esta disminución con la degeneración del contacto sináptico neuromuscular y los sarcómeros cercanos. En la presente tesis, se obtuvieron resultados similares confirmando estos resultados. En los músculos tratados con neostigmina, con una dosis única se observó un incremento de la frecuencia y por el contrario, con dosis repetidas subcutáneas no se observaron cambios en la frecuencia. Por otro lado, los resultados obtenidos con los otros anticolinesterásicos (Rivastigmina, Piridostigmina y Fasciculina II) no se obtuvieron cambios en la frecuencia de MEEPs obteniendo resultados similares a los descritos en la bibliografía¹²⁰. Eso reafirmó la elección de la NTG, como fármaco ideal para desarrollar el modelo animal con PGM.

El aumento de la frecuencia de los MEEPs se puede interpretar de la siguiente manera. La inhibición de la AChE genera una acumulación de ACh en la hendidura sináptica. Se sabe que esto favorece que se liberen más MEPPs por activación axonal retrograda^{121,122}. Al mismo tiempo, durante la neurotransmisión también se liberan compuestos de adenosina, los cuales tienen un papel modulador en la secreción de ACh¹²². Por tanto, la NTG aumenta la frecuencia de MEEPs por diferentes vías.

5.2. CORRIENTES GALVANICAS Y MEEPs.

Como se ha visto en el artículo 2, las corrientes galvánicas revierten la acción de la NTG sobre los MEEPs dependiendo su eficacia por su intensidad y duración. Una posible explicación es que las corrientes eléctricas causan una despolarización masiva de los

terminales axonales¹²³. En esta situación, se liberan todas las vesículas sinápticas disponibles y los terminales nerviosos pueden agotarse durante un período de tiempo que dura de minutos a horas. Luego, todos los componentes de la neurotransmisión recuperan sus valores iniciales y la neurotransmisión vuelve a la normalidad. Tomando en cuenta que esta situación se mantiene durante 24 horas y que en términos de vida para los roedores es un período comparable a ~30-40 días en humanos¹²⁴, resulta factible proponer este mecanismo como explicación. Otro mecanismo que también está relacionado el cual se discutirá más adelante, son las respuestas de espasmo local. Las REL generadas por las CG, al ser de mayor velocidad y número, favorecerían el lavado de sustancias nociceptivas acumuladas en los GAGs presentes en la zona y, además, el hecho de dirigir los tratamientos ecográficamente, a las bandas tensas previamente identificadas mediante palpación, puede prevenir la posible afectación de otras estructuras, como vasos y nervios.

Otro mecanismo que puede generar el uso de las CG es la electrotaxis^{125,126}. El diferencial eléctrico generado por la corriente puede atraer células endoteliales, linfocitos o macrófagos hacia el cátodo. En el caso del músculo esquelético y los PGM, las corrientes pueden afectar a las células mediadoras de la inflamación y vascularización del área afectada.

5.3. RUIDO DE PLACA Y LOS PGM.

En la presente tesis, los registros electromiográficos realizados en los gastrocnemios de los animales tratados con NTG subcutánea presentaron un incremento del número de áreas con ruido de placa y de la frecuencia de eventos en estas áreas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el registro intracelular, ya que, si el ruido de placa es la expresión electromiográfica, de la neurotransmisión espontánea de múltiples SNMS, resulta coherente que tanto la frecuencia de MEEPs, como el ruido de placa estén aumentados.

El modelo muscular elegido para estudiar y evaluar los cambios electromiográficos, los gastrocnemios, además de ser un grupo muscular de fácil acceso, ya que están recubiertos únicamente por la piel y su localización permite una manipulación fácil para el investigador. Anatómicamente, están divididos en dos paquetes musculares, el gastrocnemio lateral y el medial, cada uno de ellos, dispone de una rama de inervación particular, procedente del nervio tibial¹²⁷. La posterior ramificación y distribución de las SNMs en cada paquete ha sido estudiada y descrita ampliamente, presentando grupos de contactos sinápticos que se distribuyen a lo largo del tejido muscular desde la inserción proximal a la distal^{128,129}. Por lo tanto, la división virtual en 12 áreas, así como, el procedimiento establecido, realizando el registro de distal a proximal, permite un examen electromiográfico exhaustivo de los músculos. De hecho, los autores Yin y colaboradores¹²⁹ recomiendan realizar un estudio de los grupos de SNMs, tomando en cuenta la ramificación nerviosa intramuscular, para poder identificar que grupos de fibras musculares presentan mayor o menor alteración y así dirigir a ellas el

tratamiento. Sin embargo, aunque esto es un objetivo deseable, hay que destacar que debido al tamaño reducido de los animales, el procedimiento para registrar la actividad eléctrica espontánea de las SNMs, insertando la aguja de EMG¹⁰, puede ser un factor limitante, dado que, cada movimiento de la aguja puede lesionar parcialmente las fibras musculares pudiendo alterar su registro. Además, como ha sido descrito en trabajos previos²⁷, se observó una actividad eléctrica asociada a la inserción y movimiento de la aguja conocido como potencial o ruido de inserción. Por ese motivo, cuando la aguja de registro ya estaba insertada en el musculo, no se realizaba ningún movimiento de avance o retroceso y se procedió a su registro, una vez registrado se volvió a manipular la aguja, se esperó unos segundos y se repitió el proceso.

Son varios los trabajos publicados que refieren alteraciones del ruido de placa relacionados con el SDM tanto en humanos¹³⁰ como en animales^{44,65}. A lo largo de la última década, se han publicado una serie de trabajos que tienen como objetivo el desarrollo y estudio de un modelo animal con PGM causados mediante lesión muscular^{35,131,132}. Concretamente, en los trabajos de Huang y colaboradores^{35,36} se propusieron evaluar la actividad eléctrica y la morfología muscular de los PGM en ratas y para generarlos desarrollaron un protocolo combinado por una contusión controlada y ejercicio. La primera fase del protocolo consistió en golpear en repetidas ocasiones el musculo vasto medial de la extremidad posterior de ratas y al día siguiente iniciar un protocolo de ejercicio en una cinta sin fin. En la siguiente fase mediante palpación identificaban las posibles zonas con bandas tensas para estudiar y grabar la actividad eléctrica mediante electromiografía. Los resultados de los registros electromiográficos de estos músculos mostraron una alta frecuencia de ruido en la placa y picos polifásicos. Un aspecto que resulta interesante de este modelo es el hallazgo de diferentes tipos de onda en el ruido de placa dependiendo del estadio de recuperación del tejido³⁶. Estos autores describen que en la cuarta semana observaron actividad eléctrica de baja amplitud, similar al ruido de placa y picos intermitentes de alta amplitud. Sin embargo, este tipo de registros están más relacionados con una lesión aguda e inflamación posterior que asociables a los PGMs. Por otro lado, a las 8 semanas observaron una disminución del ruido de placa que coincide con el plazo habitual de recuperación del tejido muscular. En un análisis más detallado de las señales mioeléctricas, Huang y colaboradores proponen que las señales tipo I y II tienen como origen el flujo de iones de Na⁺ y K⁺, las señales tipo III y IV presentan un patrón invertido y podrían tener un origen similar a las propuestas por Hubbard y Berkoff⁴³. A las señales tipo V, con un patrón fibrilar, Huang y colaboradores proponen que tienen su origen en la hipersensibilidad o inflamación crónica del sistema neuromuscular. Notar que las ondas de tipo IV y V nunca están presentes en los PGMs de los grupos control y, además, el tipo V no se observó durante el periodo de recuperación de las 4 semanas. Finalmente, Huang y colaboradores afirman que la diferencia

en el tipo de ondas presentes en el registro electromiográfico de los PGMs podría explicar la diferencia entre un punto activo y uno latente. Como se puede ver, muchos de los hallazgos electromiográficos obtenidos en el modelo de estos autores no responden en absoluto a los PGM que se registran en pacientes y si se pueden justificar por la lesión que provocan. En este sentido, el modelo de PGM propuesto en esta tesis se genera en base a la neurotransmisión espontánea alterada y sus resultados entran dentro de los que habitualmente se pueden obtener en pacientes.

5.4. LA UNIÓN NEUROMUSCULAR Y EL NÓDULO DE CONTRACCIÓN.

En la hipótesis integrada³ se describe que la alteración en la liberación espontánea de ACh en la SNM, es el primer paso para la aparición de los PGM. Con la NTG, se ha aumentado de forma artificial la liberación espontánea de ACh, provocando que los sarcómeros más cercanos al contacto sináptico se contraigan, formando un nódulo de contracción alrededor de la SNM, en ausencia de potenciales de acción. También con el objetivo de generar un modelo animal con PGM, Sigfrid Mense⁶⁰ usó un agente anti-AChE para generar experimentalmente un incremento de ACh en la SNM. Sin embargo, no obtuvo nódulos de contracción por lo que sobrepusieron estimulación eléctrica con el objetivo de añadir neurotransmisión adicional. El resultado final de la combinación provocó la aparición de discos de contracción y áreas anormalmente contraídas y lesionadas en la mayoría de las fibras, en cambio otras fibras se mantenían en perfecto estado, sin cambios histológicos observables⁶⁰. Estos autores propusieron que las áreas anormalmente contraídas son una reacción general e inespecífica típica de las lesiones observadas en fibras musculares sometidas a inmovilización forzada en posición acortada, contracción excéntrica, elongación forzada o estimulación eléctrica¹³³⁻¹³⁵. Además, Mense y colaboradores contemplaron la posibilidad que los cambios histológicos observados pudieran ser artefactos del procesamiento histológico o por la inyección intramuscular del anti-AChE aunque lo descartaron dado que establecieron criterios para prevenirlas. Por último, hay que comentar que Mense y colaboradores procesaron todas las muestras histológicas con el fijador paraformaldehído, hecho que puede considerarse como un posible factor perturbador para la identificación de los nódulos de contracción, como a continuación trataremos.

En la presente tesis, no se observaron efectos directos sobre los músculos derivados de la inyección, ya que esta se administró subcutáneamente y en un área diferente al músculo estudiado. Además, los modelos musculares utilizados presentan unas características intrínsecas que hay que destacar. Tanto el LAL como el diafragma, son músculos planos y únicamente se encuentran cubiertos por otros músculos y/o tejido conectivo que pueden ser retirados sin lesionarlos y sin alterar los nervios o vasos sanguíneos intramusculares. En definitiva, conservando la integridad del tejido y permitiendo un estudio con menos

interferencias. Además, permiten prescindir del uso de fijadores, procedimiento que tiene como objetivo, preservar las características tisulares de las muestras, pero que puede alterar la visualización de los GAGs, debido a su menor interacción química con los fijadores^{136,137}, hecho que puede disminuir su concentración durante los procedimientos de histología. Esta situación la identificamos durante el desarrollo del modelo animal con PGM y nos condujo a modificar el protocolo de tinción PAS azul alcian, después de consultar con un experto en anatomía patológica.

Por otro lado, para tratar explicar los cambios histológicos observados, en que algunas fibras presentaban alteraciones y otras no, Mense y colaboradores⁶⁰ apoyándose en los resultados de trabajos previos sujetos al tratamiento con anti-AChE^{138,139} propusieron que estos cambios se producen en fibras musculares de tipología diferente a las dominantes del músculo (sea I o II). Así, estas fibras, al estar en condiciones desfavorables son más susceptibles de lesionarse y presentar las alteraciones descritas. Recordemos que el modelo de estudio utilizado por Mense y colaboradores, el gastrocnemio, presenta predominantemente fibras de tipo II. En los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, también se observó esta distribución irregular de cambios en las SNMs del mismo musculo y entre diferentes músculos, aun así no se han podido entender los mecanismos exactos que favorecen que algunas fibras presenten nódulos y otros no. Notar sin embargo que en la presente tesis se llevó a cabo una batería de experimentos con dos tipos de músculos, el diafragma (músculo con mayor porcentaje de fibras tónicas) y el LAL (músculos con mayor porcentaje de fibras fásicas). Hay que recordar que se obtuvo una mayor liberación de ACh de forma espontánea en experimentos *in toto*, en el músculo fásico (LAL) en comparación a los obtenidos en el musculo tónico (Diafragma), soportando los argumentos de la hipótesis planteada por Mense y colaboradores.

Por otro lado, Huang y colaboradores en el modelo animal con PGM generados por el protocolo de contusión de comentado anteriormente³⁵ analizaron las muestras con el microscopio óptico y describieron que varias fibras musculares tenían forma circular o elíptica a la sección transversal y, además, fibras cónicas con diferentes grosores a la sección longitudinal. Los autores sugieren que estas morfologías se corresponden con las propuestas por Simons y colaboradores^{1,51} en que las fibras musculares con PGM presentan en su zona central más grosor debido al nódulo y en los extremos presentarían un menor tamaño. Este modelo de contusión³⁵ se basa en que las lesiones musculares son probablemente uno de los mecanismos generadores y/o perpetuadores de PGM aunque como modelo presenta algunos puntos cuestionables. Huang y colaboradores afirman que las muestras observadas en su trabajo presentaban fibras musculares con nódulos de contracción, que presentan una mayor densidad en comparación con las fibras control y que solo pueden ser comparadas con los trabajos de Simons y colaboradores⁵¹. Otros trabajos usando una metodología similar^{140,141} en

los que se evalúa el efecto de la contusión en tejido muscular, también se observaron cambios descritos en la forma y tamaño de las fibras musculares, pero en estos trabajos los asociaban al proceso regenerativo propio del tejido muscular. Además, en las imágenes de los tejidos tratados ofrecidas por Huang y colaboradores³⁵, no se pueden identificar signos de acortamiento o cambios en el patrón de los sarcómeros y que, en trabajos previos⁵⁵ y en la presente tesis, si se observan.

Otro punto para debatir del modelo de PGM por contusión, es la relación entre los cambios morfológicos de la fibra muscular, con el correspondiente contacto sináptico, zona donde Simons y colaboradores sitúan el foco de origen del PGM. En un trabajo más reciente, Liu y colaboradores¹⁴² aportan imágenes de nódulos de contracción adyacentes a los contactos sinápticos en este modelo de contusión. Para obtenerlas utilizaron la técnica de Karnovsky Roots, que, mediante un análogo de la ACh (ioduro de tiocolina) marcado con cobre que, al ser hidrolizado por la AChE sináptica, precipita el cobre coloreando el perfil sináptico. Aunque, hay que destacar que esta técnica precisa de una fijación previa con formol, hecho que como previamente se ha comentado, puede ser suficiente para alterar los nódulos de contracción formados alrededor de la SNM, objetivo del estudio. Pese a todo ello, las imágenes son impecables.

Durante el desarrollo del modelo animal con PGM presentado en esta tesis y con la intención de evidenciar la relación entre los nódulos de contracción obtenidos con la técnica de PAS –Alcián y los contactos sinápticos, se utilizó un marcaje con α -bungarotoxina de los receptores de la ACh (AChR). Esta técnica de permitió delimitar su perímetro y medir las áreas de las SNM. Con ello se identificó una disminución del tamaño del área de las SNM, confirmando que los nódulos de contracción observados con la técnica PAS-Alcian se correspondían con las uniones neuromusculares.

En este sentido, en el año 2020, Gerwin y colaboradores publicaron un trabajo en el que mediante microscopia electrónica evaluaron muestras de tejido muscular humano, obtenido en puntos previamente identificados como PGM en sujetos con bandas tensas con y sin signos clínicos de SDM¹⁴³. Pero, en esta ocasión los autores hallaron un bajo número de sujetos con sarcómeros contracturados, tan solo 2 de los 15 sujetos estudiados. Ante estos resultados los autores se cuestionan si la obtención de las muestras, examinada y marcada previamente por un investigador experto, significa que el PGM es un fenómeno poco común o si las biopsias se tomaron en el sitio incorrecto. Sin embargo, reconocen que las muestras se tomaron solicitando a los sujetos que relajaran la zona del trapecio, de donde se iba a obtener la biopsia, pero, aun así, podía haber cierta contracción, desviando el punto de obtención del punto marcado inicial. Este factor se hubiese podido compensar tomando una biopsia mayor tamaño, pero a costa de generar mayor lesión en los pacientes.

Hong y Torigoe⁶⁵, describieron que las REL disminuyen a medida que se alejan del punto gatillo en la banda tensa, al mismo tiempo que disminuye el RP, por este motivo Gerwin y colaboradores¹⁴³ buscaron los PGM en la zona de la banda tensa. Sin embargo, no hallaron contactos sinápticos en las zonas estudiadas, ni tampoco consiguieron establecer una relación entre los PGM y los nódulos de contracción en el aparato contráctil. El conjunto de estos argumentos sugiere que es posible que los nódulos con contracturas ocurran por razones que no se hayan considerado, por no estar relacionadas directamente con los PGM o con el proceso nociceptivo. En su discusión Gerwin y colaboradores¹⁴³ señalan al artículo publicado por nuestro grupo de investigación y parte de esta tesis, ya que durante el desarrollo de nuestro modelo, observamos que los procesos de fijación podían alterar la visualización de los nódulos de contracción y la presencia de GAGs. Sin embargo, Gerwin y colaboradores no creen que sea lo ocurrido en su trabajo, dado que Hudson y colaboradores obtuvieron imágenes de nódulos de contracción subsinápticos inducidos por NTG, usando fijadores. Además, recordemos el trabajo de Liu y colaboradores¹⁴² con el modelo de contusión muscular en que obtuvieron imágenes de nódulos de contracción con sinapsis asociadas mediante la técnica de Karnowsky-Roots que precisa de la fijación de los músculos. También en el artículo 1 de la presente tesis se usó la técnica de inmunohistoquímica para demostrar la existencia indirecta de nódulos de contracción subsinápticos y los resultados demostraron esa relación, pese a que esta técnica precisa de fijación de la muestra, aunque en su forma más suave (paraformaldehído al 4%). Resumiendo, parece que la relación de los nódulos de contracción en los PGM aún no está completamente zanjada.

5.5. GLUCOSAMINOGLICANOS Y PGM.

El análisis de las imágenes de microscopía electrónica de nódulos de contracción publicadas en trabajos previos^{55,57,58}, después de aplicar NTG a dosis terapéuticas muestran que existe un espacio anormalmente agrandado entre las fibras musculares adyacentes y, a veces, la presencia de fibroblastos es evidente. Usando la escala de las propias fotografías el aumento de diámetro de la fibra muscular debido a la contracción de algunos sarcómeros es de aproximadamente 1 μm . Por lo tanto, se necesitarían miles de fibras musculares con nódulos de contracción localizados en la misma área para lograr un PGM palpable en humanos. Estas imágenes sugieren que en las áreas con PGM están ocurriendo otros cambios tisulares que podrían contribuir a generar un nódulo palpable. Shah y colaboradores^{17,144} describieron que el medio extracelular adyacente a los PGM activos presenta protones, sustancias nociceptivas y proinflamatorias y estas sustancias pueden sensibilizar los nociceptores musculares causando hiperalgesia muscular. Estas sustancias, especialmente los protones, pueden irritar a los fibroblastos¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Estas células son las

responsables de regular la producción y mantenimiento de colágeno y glucosaminoglicanos (GAGs) en la matriz extracelular muscular (MEC). Los fibroblastos, irritados por las sustancias nociceptivas pueden iniciar una producción anómala de GAGs. En el artículo 1 de la presente tesis se demostró que estos GAGs se acumulan en la proximidad de los nódulos de contracción¹³⁶. Los GAGs son altamente higroscópicos absorbiendo líquidos y sustancias en dilución, lo que aumenta el volumen de la zona de nódulos de contracción, contribuyendo a aumentar el tamaño del PGM, hasta que son palpables. De este modo, puede explicarse que cuando se aplican técnicas masaje y compresión como tratamiento de los PGM se genera un efecto de drenaje del área PGM que, al exprimir o generar una contracción muscular, el líquido y el contenido retenido en los GAGs, reduce su volumen y eliminar o disminuir la cantidad de sustancias nociceptivas¹⁸, disminuyendo así la sintomatología.

El tejido conectivo está ampliamente distribuido en nuestra economía llenando espacios entre tejidos y ofreciendo una base de sujeción para dar forma a órganos y permitiendo la circulación de vasos y nervios. En el tejido muscular la MEC está formado por colágenos de diferentes tipos, glicoproteínas, proteoglicanos y elastina¹⁴⁶. En los últimos años se ha ahondado mucho sobre el papel de la MEC en el desarrollo, crecimiento, reparación muscular. También en la transmisión de la fuerza generada por el aparato contráctil formando un entramado entre las fibras y que permite dirigir el movimiento generado hacia las inserciones tendinosas¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Así existen múltiples enfermedades relacionadas con las alteraciones de la MEC¹⁴⁹ como por ejemplo, la fibrosis muscular caracterizada por una acumulación anormal de tejido conectivo que provocan cambios en el funcionamiento de la MEC. Estos cambios también se han hallado en miopatías como la sarcopenia relacionada con la edad, la distrofia muscular, incluso se ha observado que alteraciones metabólicas como la diabetes. Alteraciones en la MEC pueden generar cambios que alterarían el funcionamiento del tejido muscular y cumplir con sus funciones¹⁵¹. En este punto hay que considerar los recientes comentarios de Dommerholt y colaboradores¹⁵² que sugieren realizar un estudio del tipo de GAGs presentes en estas zonas contracturadas, adyacentes a las SNMs. Propuesta para tener en cuenta para futuros trabajos para describir más ampliamente el modelo animal con PGM y evaluar el efecto de los tratamientos.

5.6. RESPUESTA DE ESPASMO LOCAL.

La relevancia de la REL en la eficacia del tratamiento de los pacientes con PGM está muy debatida. Sin embargo, la trascendencia de hallar RELs en el desarrollo de un modelo animal es evidente. La evaluación del dolor en animales es complicada y con algunos riesgos, por lo tanto la presencia de un signo patognomónico y de reconocido papel en la identificación y tratamiento de los PGM en pacientes^{1,153}, permite una mejor caracterización del modelo. De hecho, en la presente tesis el modelo animal fue puesto a prueba por seis pares de

fisioterapeutas expertos en el diagnóstico y tratamiento de los PGM en pacientes. Todos coincidieron en la presencia de una banda tensa palpable. A diferencia de los pacientes, a fin de disminuir el riesgo de sufrimiento y posible reacción al dolor durante la exploración, los animales permanecieron anestesiados.

La principal aportación del uso de la ecografía en el presente modelo ha sido la observación y registro de las RELs con una buena calidad de imagen. La combinación de la técnica de PS y la ecografía para registrar las REL, ya ha sido probada previamente en pacientes. Rha y colaboradores⁶⁸ afirman que el uso de la guía ecográfica permite identificar la trayectoria de la aguja en el tejido muscular tratado, permitiendo mejorar la punción de la musculatura profunda mejorando los resultados terapéuticos. Los resultados obtenidos en el presente estudio (artículos 1 y 2) nos permiten afirmar que la guía ecográfica permite visualizar la aguja de tratamiento y su direccionamiento, además permite identificar las respuestas de espasmo local en el grupo muscular tratado y poder así, cuantificar su número y velocidad.

En este sentido, se observó que la CGI aumentó considerablemente las respuestas de espasmo local tanto en número y en velocidad, en comparación a la PS. Por lo tanto, además del efecto ya descrito a nivel electrofisiológico, las RELs más potentes también contribuirían al drenaje y lavado de la zona disminuyendo la concentración de las sustancias nociceptivas que puedan estar acumuladas en los GAGs. Se precisan estudios que profundicen este mecanismo así como en el efecto de electrotaxis, generada por la CG sobre varios tipos celulares^{125,154,155} (macrófagos, linfocitos o células endoteliales), que pueden afectar a los mediadores inflamatorios y vasculares favoreciendo el tratamiento de los PGM.

5.7. TEMPERATURA, MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LAS AGUJAS UTILIZADAS EN LA APLICACIÓN INTRAMUSCULAR DE CORRIENTE GALVANICA.

Históricamente la corriente galvánica se ha usado en cirugía para provocar ablación térmica. Hay abundantísimos ejemplos en la bibliografía como ejemplo en los estudios pioneros en la ablación electrolítica de tumores hepáticos^{112,156,157} en los que se describe ciertas acciones beneficiosas relacionadas con revascularización del tejido hepático o influyendo en la reacción inflamatoria. Para la acción cauterizante térmica de estos tratamientos precisa de un amperaje muy alto, 60-80mA, que se prolonga durante periodos también extremadamente largos (20-35 min). Notar que en el estudio presentado en esta tesis (artículo 3) los parámetros evaluados fueron muy inferiores tanto en amperaje como en duración lo que justifica que el tratamiento con la corriente galvánica haya sido completamente atermal. Respecto al cambio de resistencia de las agujas por la aplicación de la corriente galvánica no se observó ninguna variación entre la parte de la aguja insertada en el tejido tratado, respecto a la parte externa. Es decir que queda justificado que no cambie la

temperatura ya que, según la ley de Ohm, un aumento de resistencia implica un aumento de temperatura de una manera casi proporcional¹⁵⁸.

Además, en el artículo 3 de esta tesis no se observó ninguna aguja con imperfecciones de fábrica antes de su uso. En un trabajo previo, Bosque y colaboradores¹⁵⁹ evaluando agujas de punción seca de diferentes marcas tampoco encontraron ninguna aguja con imperfecciones de fábrica antes de su uso y solo observaron defectos después de realizar 10 impactos en el hueso. Sin embargo, Hwang y colaboradores¹¹⁸ evaluando las agujas post tratamiento con corriente eléctrica continua y mostraron una gran corrosión de las agujas tras su utilización. Estos autores demostraron la acumulación de compuestos metálicos en un modelo de gelatina usada habitualmente en las prácticas de acupuntura. Hay que notar que Hwang y colaboradores utilizaron dos protocolos de bajo amperaje (0,05 mA y 1 mA) pero durante un tiempo notablemente más largo (30 minutos) que los usados en el artículo 3 (3 y 7 segundos). De forma similar Lee y colaboradores¹⁶⁰ trabajando con otro tipo de agujas, hallaron también deterioro de la superficie de las agujas. Parece obvio que los 3mA del presente estudio, con una duración mucho menor, no genere ninguna variación ni estructural ni de pérdida de materiales. Por el contrario, cuando los 3mA durante 3 segundos se repiten un número de veces notablemente mayor, provoca una variación importante en la composición de las agujas y una alteración estructural. Así la pérdida observada en este último protocolo nos indica que los metales faltantes han quedado en los tejidos del ratón. Por lo tanto, evitar la aplicación de CGI por un tiempo elevado o con demasiadas repeticiones debería prevenir acumulación de materiales en el tejido tratado.

6. CONCLUSIONES

- 1.- El tratamiento con un anti-AChE provoca un aumento sostenido de ACh en la hendidura sináptica el cual induce un aumento del ruido de la placa y la frecuencia de MEEP. Esto tiene consecuencias que simulan un punto gatillo miofascial:
 - 1.1.- Aparecen nódulos de contracción que están rodeados de abundantes glucosaminoglicanos (GAG).
 - 1.2.- Aparecen nódulos de contracción situados en el área subsináptica. En este modelo animal no se palparon PGM, pero si bandas tensas
 - 1.3.- Si se estimulan las bandas tensas con una aguja de punción seca aparecen RELs objetivables tanto por palpación como por registro ecográfico.
 - 1.4.- Ninguno de los hallazgos alcanzados con la aplicación de neostigmina subcutánea (aumento de MEPPs y ruido de placa, presencia de PGM) duraron más de 3 días.
 - 1.5.- La administración repetida de anti-AChE cada 12 horas provoca lesión muscular dentro de las primeras 24 horas.

- 2.- Las corrientes galvánicas intramusculares revierten la elevada neurotransmisión espontánea generada por la acción de la neostigmina tanto a las 3 como a las 24 horas.
 - 2.1.- La aplicación de corrientes eléctricas produjo un aumento en el número y en la velocidad de RELs, en comparación con la punción seca.
 - 2.2.- Las dosis de corriente eléctrica 1.5mA durante 5 segundos y 3 aplicaciones y 3mA durante 3 segundos y 3 aplicaciones son más efectivas para disminuir los PGM en un modelo animal.

- 3.- La aplicación de corriente galvánica intramuscular, es un procedimiento seguro si no se aplican parámetros abusivos.
 - 3.1.- El uso de la CG no produce en las agujas alteración térmica local.
 - 3.2.- El uso de la CG no altera las propiedades eléctricas de la aguja, no genera pérdida de sus metales y no modifican su morfología durante su uso. No obstante, si los parámetros resultan abusivos es posible una alteración de la aguja con un riesgo potencial para el paciente.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Simons D, Travell J, Simons L. Travell and Simons' Myofascial Pain and Dysfunction: The Trigger Point Manual. Published online 1999.
2. Shah JP, Thaker N, Heimur J, Aredo J V., Sikdar S, Gerber L. Myofascial trigger points then and now: A historical and scientific perspective. *PM R*. 2015;7(7):746-761. doi:10.1016/j.pmrj.2015.01.024
3. Simons DG. Review of enigmatic MTrPs as a common cause of enigmatic musculoskeletal pain and dysfunction. *J Electromyogr Kinesiol*. 2004;14(1):95-107. doi:10.1016/j.jelekin.2003.09.018
4. Myburgh C, Larsen AH, Hartvigsen J. A Systematic, Critical Review of Manual Palpation for Identifying Myofascial Trigger Points: Evidence and Clinical Significance. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008;89(6):1169-1176. doi:10.1016/j.apmr.2007.12.033
5. Ge HY, Monterde S, Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L. Latent myofascial trigger points are associated with an increased intramuscular electromyographic activity during synergistic muscle activation. *J Pain*. 2014;15(2):181-187. doi:10.1016/j.jpain.2013.10.009
6. Bron C, Dommerholt JD. Etiology of myofascial trigger points. *Curr Pain Headache Rep*. 2012;16(5):439-444. doi:10.1007/s11916-012-0289-4
7. Desai MJ, Saini V, Saini S. Myofascial Pain Syndrome: A Treatment Review. *Pain Ther*. 2013;2(1):21-36. doi:10.1007/s40122-013-0006-y
8. Lluch E, Nijs J, De Kooning M, et al. Prevalence, Incidence, Localization, and Pathophysiology of Myofascial Trigger Points in Patients With Spinal Pain: A Systematic Literature Review. *J Manipulative Physiol Ther*. 2015;38(8):587-600. doi:10.1016/j.jmpt.2015.08.004
9. Fleckenstein J, Zaps D, R ger LJ, et al. Discrepancy between prevalence and perceived effectiveness of treatment methods in myofascial pain syndrome: Results of a cross-sectional, nationwide survey. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11. doi:10.1186/1471-2474-11-32
10. Hong CZ, Simons DG. Pathophysiologic and electrophysiologic mechanisms of myofascial trigger points. *Arch Phys Med Rehabil*. 1998;79(7):863-872. doi:10.1016/s0003-9993(98)90371-9
11. Simons DG. Clinical and etiological update of myofascial pain from trigger points. *J Musculoskelet Pain*. 1996;4(1-2):93-122. doi:10.1300/J094v04n01_07
12. Sikdar S, Shah JP, Gebreab T, et al. Novel Applications of Ultrasound Technology to Visualize and Characterize Myofascial Trigger Points and Surrounding Soft Tissue. *Arch Phys Med Rehabil*. 2009;90(11):1829-1838. doi:10.1016/j.apmr.2009.04.015
13. Jafari M, Bahrpeyma F, Mokhtari-Dizaji M, Nasiri A. Novel method to measure active myofascial trigger point stiffness using ultrasound imaging. *J Bodyw Mov Ther*.

- 2018;22(2):374-378. doi:10.1016/j.jbmt.2017.06.019
14. Kumbhare D, Shaw S, Grosman-Rimon L, Noseworthy MD. Quantitative Ultrasound Assessment of Myofascial Pain Syndrome Affecting the Trapezius: A Reliability Study. *J Ultrasound Med*. 2017;36(12):2559-2568. doi:10.1002/jum.14308
 15. Partanen J. Electromyography in Myofascial Syndrome. In: *EMG Methods for Evaluating Muscle and Nerve Function*. InTech; 2012. doi:10.5772/25774
 16. Gerwin RD, Dommerholt J, Shah JP. An Expansion of Simons' Integrated Hypothesis of Trigger Point Formation. Published online 2004.
 17. Shah JP, Phillips TM, Danoff J V., Gerber LH. An in vivo microanalytical technique for measuring the local biochemical milieu of human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2005;99(5):1977-1984. doi:10.1152/jappphysiol.00419.2005
 18. Shah JP, Danoff J V., Desai MJ, et al. Biochemicals Associated With Pain and Inflammation are Elevated in Sites Near to and Remote From Active Myofascial Trigger Points. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008;89(1):16-23. doi:10.1016/j.apmr.2007.10.018
 19. Gerwin RD, Dommerholt J, Shah JP. An expansion of Simons' integrated hypothesis of trigger point formation. *Curr Pain Headache Rep*. 2004;8(6):468-475. doi:10.1007/s11916-004-0069-x
 20. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2020;12(1):1-46. doi:10.1002/wsbm.1462
 21. Salpeter MM, Loring RH. Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: Properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol*. 1985;25(4):297-325. doi:10.1016/0301-0082(85)90018-8
 22. Rash J. The vertebrate neuromuscular junction. Edited by M. M. Salpeter from the series *Neurology and Neurobiology* 23. Alan R. Liss, Inc., New York, 1987, 439 pp. *Synapse*. 1988;2(3):334-336. doi:10.1002/syn.890020326
 23. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Neurotransmitter Receptors. Published online 2000.
 24. Stanley EF. Single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron*. 1993;11(6):1007-1011. doi:10.1016/0896-6273(93)90214-C
 25. Katz B, Miledi R. The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J Physiol*. 1972;224(3):665-699. doi:10.1113/jphysiol.1972.sp009918
 26. Wiederholt W. "End-plate noise" in electromyography. *Neurology*. 1970;20:214-224.
 27. Kimura J. *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve and Muscle*. Oxford University Press; 2014. doi:10.1093/med/9780199738687.001.0001
 28. P. Fatt BK. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol*. 1952;117:109-128.

29. Engstrom JW. Electrodiagnostic medicine, 2nd edition. *Muscle Nerve*. 2003;28(2):254-254. doi:10.1002/mus.10399
30. Partanen J V., Ojala TA, Arokoski JPA. Myofascial syndrome and pain: A neurophysiological approach. *Pathophysiology*. 2010;17(1):19-28. doi:10.1016/j.pathophys.2009.05.001
31. Santafé MM, Salon I, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J. Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci*. 2003;17(1):119-127. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02428.x
32. Wessler I. Acetylcholine release at motor endplates and autonomic neuroeffector junctions: A comparison. *Pharmacol Res*. 1996;33(2):81-94. doi:10.1006/phrs.1996.0014
33. Reiner E, Aldridge WN. Effect of pH on inhibition and spontaneous reactivation of acetylcholinesterase treated with esters of phosphorus acids and of carbamic acids. *Biochem J*. 1967;105(1):171-179. doi:10.1042/bj1050171
34. Reinöhl J, Hoheisel U, Unger T, Mense S. Adenosine triphosphate as a stimulant for nociceptive and non-nociceptive muscle group IV receptors in the rat. *Neurosci Lett*. 2003;338(1):25-28. doi:10.1016/S0304-3940(02)01360-5
35. Huang QM, Ye G, Zhao ZY, Lv JJ, Tang L. Myoelectrical activity and muscle morphology in a rat model of myofascial trigger points induced by blunt trauma to the vastus medialis. *Acupunct Med*. 2013;31(1):65-73. doi:10.1136/acupmed-2012-010129
36. Huang QM, Lv JJ, Ruanshi QM, Liu L. Spontaneous electrical activities at myofascial trigger points at different stages of recovery from injury in a rat model. *Acupunct Med*. 2015;33(4):319-324. doi:10.1136/acupmed-2014-010666
37. Liu QG, Huang QM, Liu L, Nguyen TT. Structural and functional abnormalities of motor endplates in rat skeletal model of myofascial trigger spots. *Neurosci Lett*. 2019;711. doi:10.1016/j.neulet.2019.134417
38. McNulty WH, Gevirtz RN, Hubbard DR, Berkoff GM. Needle electromyographic evaluation of trigger point response to a psychological stressor. *Psychophysiology*. 1994;31(3):313-316. doi:10.1111/j.1469-8986.1994.tb02220.x
39. Chen J-T, Chen S-M, Kuan T-S, et al. *Phentolamine Effect on the Spontaneous Electrical Activity of Active Loci in a Myofascial Trigger Spot of Rabbit Skeletal Muscle*.; 1998.
40. Hidalgo-Lozano A, Fernández-de-las-Peñas C, Calderón-Soto C, Domingo-Camara A, Madeleine P, Arroyo-Morales M. Elite swimmers with and without unilateral shoulder pain: Mechanical hyperalgesia and active/latent muscle trigger points in neck-shoulder muscles. *Scand J Med Sci Sport*. 2013;23(1):66-73. doi:10.1111/j.1600-

0838.2011.01331.x

41. Blotnick E, Anglister L. Exercise modulates synaptic acetylcholinesterase at neuromuscular junctions. *Neuroscience*. 2016;319:221-232. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.044
42. Weeks VD TJ. How to give painless injections. *AMA Sci Exhib*. 1957;Grune & St:318-322.
43. Hubbard DR, Berkoff GM. Myofascial trigger points show spontaneous needle emg activity. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1993;18(13):1803-1807. doi:10.1097/00007632-199310000-00015
44. Simons DG, Hong CZ, Simons LS. Prevalence of spontaneous electrical activity at trigger spots and at control sites in rabbit skeletal muscle. *J Musculoskelet Pain*. 1995;3(1):35-48. doi:10.1300/J094v03n01_04
45. Ge HY, Fernández-de-las-Peñas C, Yue SW. Myofascial trigger points: Spontaneous electrical activity and its consequences for pain induction and propagation. *Chin Med*. 2011;6. doi:10.1186/1749-8546-6-13
46. Kuan TS, Chen JT, Chen SM, Chien CH, Hong CZ. Effect of botulinum toxin on endplate noise in myofascial trigger spots of rabbit skeletal muscle. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002;81(7):512-520. doi:10.1097/00002060-200207000-00008
47. Ellaway P, Taylor A, Durbaba R, Rawlinson S. Role of the fusimotor system in locomotion. *Adv Exp Med Biol*. 2002;508:335-342. doi:10.1007/978-1-4615-0713-0_39
48. Santini M, Ibatá Y. The fine structure of thin unmyelinated axons within muscle spindles. *Brain Res*. 1971;33(2):289-302. doi:10.1016/0006-8993(71)90104-1
49. Couppe C, Midttun A, Hilden J, Jørgensen U, Oxholm P, Fuglsang-Frederiksen A. Spontaneous needle electromyographic activity in myofascial trigger points in the infraspinatus muscle: A blinded assessment. *J Musculoskelet Pain*. 2001;9(3):7-16. doi:10.1300/J094v09n03_02
50. Simons DG. The nature of myofascial trigger points [2]. *Clin J Pain*. 1995;11(1):83-84. doi:10.1097/00002508-199503000-00013
51. Simons DG, Stolov WC. Microscopic features and transient contraction of palpable bands in canine muscle. *Am J Phys Med*. 1976;55(2):65-88.
52. Reitingner A, Radner H, Tilscher H, Hanna M, Windisch A FW. Morphologic study of trigger points. *Manuelle Medizin*. 1996;34:256–252.
53. Ballyns JJ, Shah JP, Hammond J, Gebreab T, Gerber LH, Sikdar S. Objective sonographic measures for characterizing myofascial trigger points associated with cervical pain. *J Ultrasound Med*. 2011;30(10):1331-1340. doi:10.7863/jum.2011.30.10.1331
54. Turo D, Otto P, Shah JP, et al. Ultrasonic characterization of the upper trapezius muscle

- in patients with chronic neck pain. *Ultrason Imaging*. 2013;35(2):173-187. doi:10.1177/0161734612472408
55. Hudson CS, Rash JE, Tiedt TN, Albuquerque EX. Neostigmine-induced alterations at the mammalian neuromuscular junction. II. Ultrastructure. *J Pharmacol Exp Ther*. 1978;205(2):340-356.
 56. Tiedt TN, Albuquerque EX, Hudson CS, Rash JE. Neostigmine-induced alterations at the mammalian neuromuscular junction. I. Muscle contraction and electrophysiology. *J Pharmacol Exp Ther*. 1978;205(2):326-339.
 57. Duxson MJ, Vrbová G. Inhibition of acetylcholinesterase accelerates axon terminal withdrawal at the developing rat neuromuscular junction. *J Neurocytol*. 1985;14(3):337-363. doi:10.1007/BF01217751
 58. J. G. Blackman WGH RJMDWP. Supercontracture at endplates of mammalian muscle fibres caused by decamethonium and related agonists. *Proc Univ Otago Med Sch*. 1978;56:71-72.
 59. Ariëns AT, Meeter E, Wolthuis OL, van Benthem RMJ. Reversible necrosis at the end-plate region in striated muscles of the rat poisoned with cholinesterase inhibitors. *Experientia*. 1969;25(1):57-59. doi:10.1007/BF01903894
 60. Mense S, Simons DG, Hoheisel U, Quenzer B. Lesions of rat skeletal muscle after local block of acetylcholinesterase and neuromuscular stimulation. *J Appl Physiol*. 2003;94(6):2494-2501. doi:10.1152/jappphysiol.00727.2002
 61. Hong CZ. Lidocaine injection versus dry needling to myofascial trigger point: The importance of the local twitch response. *Am J Phys Med Rehabil*. 1994;73(4):256-263. doi:10.1097/00002060-199407000-00006
 62. Rivner MH. The neurophysiology of myofascial pain syndrome. *Curr Pain Headache Rep*. 2001;5(5):432-440. doi:10.1007/s11916-001-0054-6
 63. Chou LW, Kao MJ, Lin JG. Probable mechanisms of needling therapies for myofascial pain control. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/705327
 64. Hong CZ. Lidocaine injection versus dry needling to myofascial trigger point: The importance of the local twitch response. *Am J Phys Med Rehabil*. 1994;73(4):256-263. doi:10.1097/00002060-199407000-00006
 65. Hong CZ, Torigoe Y. Electrophysiological characteristics of localized twitch responses in responsive taut bands of rabbit skeletal muscle fibers. *J Musculoskelet Pain*. 1994;2(2):17-43. doi:10.1300/J094v02n02_03
 66. Tekin L, Akarsu S, Durmuş O, et al. The effect of dry needling in the treatment of myofascial pain syndrome: a randomized double-blinded placebo-controlled trial. doi:10.1007/s10067-012-2112-3

67. Perreault T, Dunning J, Butts R. The local twitch response during trigger point dry needling: Is it necessary for successful outcomes? *J Bodyw Mov Ther.* 2017;21(4):940-947. doi:10.1016/j.jbmt.2017.03.008
68. Rha DW, Shin JC, Kim YK, Jung JH, Kim YU, Lee SC. Detecting local twitch responses of myofascial trigger points in the lower-back muscles using ultrasonography. *Arch Phys Med Rehabil.* 2011;92(10):1576-1580.e1. doi:10.1016/j.apmr.2011.05.005
69. Koppenhaver SL, Walker MJ, Rettig C, et al. The association between dry needling-induced twitch response and change in pain and muscle function in patients with low back pain: a quasi-experimental study. *Physiother (United Kingdom).* 2017;103(2):131-137. doi:10.1016/j.physio.2016.05.002
70. Martín-Pintado-Zugasti A, Fernández-Carnero J, León-Hernández JV, et al. Postneedling Soreness and Tenderness After Different Dosages of Dry Needling of an Active Myofascial Trigger Point in Patients With Neck Pain: A Randomized Controlled Trial. *PM R.* 2018;10(12):1311-1320. doi:10.1016/j.pmrj.2018.05.015
71. Vier C, Almeida MB de, Neves ML, Santos ARS dos, Bracht MA. The effectiveness of dry needling for patients with orofacial pain associated with temporomandibular dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Brazilian J Phys Ther.* 2019;23(1):3-11. doi:10.1016/j.bjpt.2018.08.008
72. Hong CZ, Simons DG. Pathophysiologic and electrophysiologic mechanisms of myofascial trigger points. *Arch Phys Med Rehabil.* 1998;79(7):863-872. doi:10.1016/S0003-9993(98)90371-9
73. CZ Hong JCSC. Histological findings of responsive loci in a myofascial trigger spot of rabbit skeletal muscle from where localized twitch responses could be elicited. *Arch Phys Med Rehabil.* 1996;77:962-962.
74. Hong CZ, Torigoe Y, Yu J. The localized twitch responses in responsive taut bands of rabbit skeletal muscle fibers are related to the reflexes at spinal cord level. *J Musculoskelet Pain.* 1995;3(1):15-33. doi:10.1300/J094v03n01_03
75. Hong CZ. Persistence of local twitch response with loss of conduction to and from the spinal cord. *Arch Phys Med Rehabil.* 1994;75(1):12-16. doi:10.1016/0003-9993(94)90330-1
76. Zhang H, Lü JJ, Huang QM, Liu L, Liu QG, Eric OA. Histopathological nature of myofascial trigger points at different stages of recovery from injury in a rat model. *Acupunct Med.* 2017;35(6):445-451. doi:10.1136/acupmed-2016-011212
77. Barros-Neto JA, Souza-Machado A, Kraychete DC, et al. Selenium and Zinc Status in Chronic Myofascial Pain: Serum and Erythrocyte Concentrations and Food Intake. Ahmad A, ed. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164302. doi:10.1371/journal.pone.0164302
78. Panta P. The possible role of meditation in myofascial pain syndrome: A new

- hypothesis. *Indian J Palliat Care*. 2017;23(2):180-187. doi:10.4103/0973-1075.204239
79. Weller JL, Comeau D, Otis JAD. Myofascial Pain. *Semin Neurol*. 2018;38(6):640-643. doi:10.1055/s-0038-1673674
80. Montañez-Aguilera FJ, Valtueña-Gimeno N, Pecos-Martín D, Arnau-Masanet R, Barrios-Pitarque C, Bosch-Morell F. Changes in a patient with neck pain after application of ischemic compression as a trigger point therapy. *J Back Musculoskelet Rehabil*. 2010;23(2):101-104. doi:10.3233/BMR-2010-0255
81. Renan-Ordine R, Alburquerque-Sendín F, De Souza DPR, Cleland JA, Fernández-De-Las-Penas C. Effectiveness of myofascial trigger point manual therapy combined with a self-stretching protocol for the management of plantar heel pain: A randomized controlled trial. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2011;41(2):43-50. doi:10.2519/jospt.2011.3504
82. Moraska AF, Schmiege SJ, Mann JD, Butryn N, Krutsch JP. Responsiveness of Myofascial Trigger Points to Single and Multiple Trigger Point Release Massages: A Randomized, Placebo Controlled Trial. *Am J Phys Med Rehabil*. 2017;96(9):639-645. doi:10.1097/PHM.0000000000000728
83. Uemoto L, Garcia MAC, Gouvêa CVD, Vilella O V., Alfaya TA. Laser therapy and needling in myofascial trigger point deactivation. *J Oral Sci*. 2013;55(2):175-181. doi:10.2334/josnusd.55.175
84. Georgoudis G, Felah B, Nikolaidis P, Damigos D. The effect of myofascial release and microwave diathermy combined with acupuncture versus acupuncture therapy in tension-type headache patients: A pragmatic randomized controlled trial. *Physiother Res Int*. 2018;23(2). doi:10.1002/pri.1700
85. Hong JO, Park JS, Jeon DG, Yoon WH, Park JH. Extracorporeal shock wave therapy versus trigger point injection in the treatment of myofascial pain syndrome in the quadratus lumborum. *Ann Rehabil Med*. 2017;41(4):582-588. doi:10.5535/arm.2017.41.4.582
86. Hong CZ. Considerations and recommendations regarding myofascial trigger point injection. *J Musculoskelet Pain*. 1994;2(1):29-59. doi:10.1300/J094v02n01_03
87. Eroğlu PK, Yılmaz Ö, Bodur H, Ateş C. A comparison of the efficacy of dry needling, lidocaine injection, and oral flurbiprofen treatments in patients with myofascial pain syndrome: A double-blind (For Injection, Groups Only), randomized clinical trial. *Turkish J Rheumatol*. 2013;28(1):38-46. doi:10.5606/tjr.2013.2779
88. Ibrahim DA, Abdelrahem HA. Cervical region trigger point Injection with dry needling versus wet needling by lidocaine in geriatric population: a comparative study. *Ain-Shams J Anesthesiol*. 2019;11(1):16. doi:10.1186/s42077-019-0026-x
89. Mayoral O, Salvat I, Martín MT, et al. Efficacy of myofascial trigger point dry needling in

- the prevention of pain after total knee arthroplasty: A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013:17-19. doi:10.1155/2013/694941
90. Cabrales LB, Ciria HC, Bruzón RP, et al. Electrochemical treatment of mouse Ehrlich tumor with direct electric current. *Bioelectromagnetics.* 2001;22(5):316-322.
 91. Ciria HMC, González MM, Zamora LO, et al. Antitumor effects of electrochemical treatment. *Chinese J Cancer Res.* 2013;25(2):223-234. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2013.03.03
 92. Vijh AK. Phenomenology and Mechanisms of Electrochemical Treatment (ECT) of Tumors. In: *Modern Aspects of Electrochemistry.* Springer US; 2007:231-274. doi:10.1007/978-0-387-31701-4_5
 93. Calzado EM, Schinca H, Cabrales LEB, García FM, Turjanski P, Olaiz N. Impact of permeabilization and pH effects in the electrochemical treatment of tumors: Experiments and simulations. *Appl Math Model.* 2019;74:62-72. doi:10.1016/j.apm.2019.04.041
 94. Nilsson E, Fontes E. Mathematical modelling of physicochemical reactions and transport processes occurring around a platinum cathode during the electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry.* 2001;53(2):213-224. doi:10.1016/S0302-4598(01)00097-6
 95. Valera-Garrido F, Minaya-Muñoz F, Medina-Mirapeix F. Ultrasound-guided percutaneous needle electrolysis in chronic lateral epicondylitis: Short-term and long-term results. *Acupunct Med.* 2014;32(6):446-454. doi:10.1136/acupmed-2014-010619
 96. Valera-Garrido F, Minaya-Muñoz F, Sánchez-Ibáñez JM, Medina-Mirapeix F, Polidori F. Short- and Long-Term Outcomes of Electrolysis Percutaneous Intratissue (Epi) in Chronic Lateral Elbow Epicondylitis. *Br J Sports Med.* 2013;47(9):e2.32-e2. doi:10.1136/bjsports-2013-092459.38
 97. Lopez-Martos R, Gonzalez-Perez LM, Ruiz-Canela-Mendez P, Urresti-Lopez FJ, Gutierrez-Perez JL, Infante-Cossio P. Randomized, double-blind study comparing percutaneous electrolysis and dry needling for the management of temporomandibular myofascial pain. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2018;23(4):e454-e462. doi:10.4317/medoral.22488
 98. Press JM, Bergfeld DA. Physical modalities. In: *Clinical Sports Medicine.* Elsevier Inc.; 2007:207-226. doi:10.1016/B978-141602443-9.50019-2
 99. Abat F, Diesel WJ, Gelber PE, Polidori F, Monllau JC, Sanchez-Ibañez JM. Effectiveness of the Intratissue Percutaneous Electrolysis (EPI®) technique and isoinertial eccentric exercise in the treatment of patellar tendinopathy at two years follow-up. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(2):188-193.

- doi:10.11138/mltj/2014.4.2.188
100. Abat F, Gelber PE, Polidori F, Monllau JC, Sanchez-Ibañez JM. Clinical results after ultrasound-guided intratissue percutaneous electrolysis (EPI®) and eccentric exercise in the treatment of patellar tendinopathy. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2015;23(4):1046-1052. doi:10.1007/s00167-014-2855-2
 101. Dean J, Bowsher D, Johnson MI. The effects of unilateral transcutaneous electrical nerve stimulation of the median nerve on bilateral somatosensory thresholds. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2006;26(5):314-318. doi:10.1111/j.1475-097X.2006.00689.x
 102. Radhakrishnan R, Sluka KA. Deep tissue afferents, but not cutaneous afferents, mediate transcutaneous electrical nerve stimulation-induced antihyperalgesia. *J Pain.* 2005;6(10):673-680. doi:10.1016/j.jpain.2005.06.001
 103. Zhang R, Lao L, Ren K, Berman BM. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain. *Anesthesiology.* 2014;120(2):482-503. doi:10.1097/ALN.000000000000101
 104. Doucet BM, Lam A, Griffin L. Neuromuscular Electrical Stimulation for Skeletal Muscle Function. *Yale J Biol Med.* 2012;85(2):201-215.
 105. Dirks ML, Wall BT, Van Loon LJC. Interventional strategies to combat muscle disuse atrophy in humans: Focus on neuromuscular electrical stimulation and dietary protein. *J Appl Physiol.* 2018;125(3):850-861. doi:10.1152/jappphysiol.00985.2016
 106. Abat F, Valles SL, Gelber PE, et al. An experimental study of muscular injury repair in a mouse model of notexin-induced lesion with EPI® technique. *BMC Sports Sci Med Rehabil.* 2015;7(1):1-7. doi:10.1186/s13102-015-0002-0
 107. Langevin HM, Churchill DL, Fox JR, Badger GJ, Garra BS, Krag MH. Biomechanical response to acupuncture needling in humans. *J Appl Physiol.* 2001;91(6):2471-2478. doi:10.1152/jappl.2001.91.6.2471
 108. Langevin HM, Churchill DL, Cipolla MJ. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. *FASEB J.* 2001;15(12):2275-2282. doi:10.1096/fj.01-0015hyp
 109. Domingo A, Mayoral O, Monterde S, Santafé MM. Neuromuscular damage and repair after dry needling in mice. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/260806
 110. Iborra-Marcos Á, Ramos-Álvarez JJ, Rodríguez-Fabián G, et al. Intratissue Percutaneous Electrolysis vs Corticosteroid Infiltration for the Treatment of Plantar Fasciosis. *Foot Ankle Int.* 2018;39(6):704-711. doi:10.1177/1071100718754421
 111. de Miguel Valtierra L, Salom Moreno J, Fernández-de-las-Peñas C, Cleland JA, Arias-Burúa JL. Ultrasound-Guided Application of Percutaneous Electrolysis as an Adjunct to Exercise and Manual Therapy for Subacromial Pain Syndrome: A Randomized Clinical

- Trial. *J Pain*. 2018;19(10):1201-1210. doi:10.1016/j.jpain.2018.04.017
112. Li K, Xin Y, Gu Y, Xu B, Fan D, Ni B. Effects of direct current on dog liver: possible mechanisms for tumor electrochemical treatment. *Bioelectromagnetics*. 1997;18(1):2-7. doi:10.1002/(sici)1521-186x(1997)18:1<2::aid-bem2>3.0.co;2-6
113. Von Euler H, Olsson JM, Hultenby K, Thörne A, Lagerstedt AS. Animal models for treatment of unresectable liver tumours: A histopathologic and ultra-structural study of cellular toxic changes after electrochemical treatment in rat and dog liver. *Bioelectrochemistry*. 2003;59(1-2):89-98. doi:10.1016/S1567-5394(03)00006-9
114. Ren RL, Vora N, Yang F, et al. Variations of dose and electrode spacing for rat breast cancer electrochemical treatment. *Bioelectromagnetics*. 2001;22(3):205-211. doi:10.1002/bem.40
115. Wemyss-Holden SA, Berry DP, Robertson GSM, Dennison AR, Hall PDLM, Maddern GJ. Electrolytic ablation as an adjunct to liver resection: Safety and efficacy in patients. *ANZ J Surg*. 2002;72(8):589-593. doi:10.1046/j.1445-2197.2002.02471.x
116. Minaya Muñoz F, Valera Garrido F, Sánchez Ibáñez JM, Medina i Mirapeix F. Estudio de coste-efectividad de la electrólisis percutánea intratisular (EPI ®) en las epicondilalgias. *Fisioterapia*. 2012;34(5):208-215. doi:10.1016/j.ft.2012.04.001
117. Tang YC, Katsuma S, Fujimoto S, Hiromoto S. Electrochemical study of Type 304 and 316L stainless steels in simulated body fluids and cell cultures. *Acta Biomater*. 2006;2(6):709-715. doi:10.1016/j.actbio.2006.06.003
118. Hwang HS, Yang EJ, Ryu YH, Lee MS, Choi S-M. Electrochemical Corrosion of STS304 Acupuncture Needles by Electrical Stimulation. *J Acupunct Meridian Stud*. 2010;3(2):89-94. doi:10.1016/S2005-2901(10)60017-9
119. McLachlan EM, Martin AR. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol*. 1981;311(1):307-324. doi:10.1113/jphysiol.1981.sp013586
120. Gebbers JO, Lötscher M, Kobel W, Portmann R, Laissue JA. Acute toxicity of pyridostigmine in rats: histological findings. *Arch Toxicol*. 1986;58(4):271-275. doi:10.1007/bf00297119
121. Santafé MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomàs J. Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci*. 2006;23(8):2048-2056. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04753.x
122. Santafe MM, Priego M, Obis T, et al. Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *Eur J Neurosci*. 2015;42(2):1775-1787. doi:10.1111/ejn.12922
123. del Castillo J, Katz B. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*. 1954;124(3):560-573. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005129

124. Katz B, Miledi R. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J Physiol.* 1969;203(3):689-706. doi:10.1113/jphysiol.1969.sp008887
125. Lin F, Baldessari F, Gyenge CC, et al. Lymphocyte Electrotaxis In Vitro and In Vivo. *J Immunol.* 2008;181(4):2465-2471. doi:10.4049/jimmunol.181.4.2465
126. Zhao M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(6):674-682. doi:10.1016/j.semdb.2008.12.009
127. Bennett M, Ho S, Lavidis N. Competition between segmental nerves at end-plates in rat gastrocnemius muscle during loss of polyneuronal innervation. *J Physiol.* 1986;381(1):351-376. doi:10.1113/jphysiol.1986.sp016331
128. Prodanov D, Thil MA, Marani E, Delbeke J, Holsheimer J. Three-dimensional topography of the motor endplates of the rat gastrocnemius muscle. *Muscle and Nerve.* 2005;32(3):292-302. doi:10.1002/mus.20378
129. Yin X, Yu T, Chen B, et al. Spatial distribution of motor endplates and its adaptive change in skeletal muscle. *Theranostics.* 2019;9(3):734-746. doi:10.7150/thno.28729
130. Itoh K, Okada K, Kawakita K, White A, Cummings M. A proposed experimental model of myofascial trigger points in human muscle after slow eccentric exercise. *Acupunct Med.* 2004;22(1):2-13. doi:10.1136/aim.22.1.2
131. Zhang J, Hoheisel U, Klein T, Magerl W, Mense S, Treede RD. High-frequency modulation of rat spinal field potentials: Effects of slowly conducting muscle vs. skin afferents. *J Neurophysiol.* 2016;115(2):692-700. doi:10.1152/jn.00415.2015
132. Zhang H, Lü JJ, Huang QM, Liu L, Liu QG, Eric OA. Histopathological nature of myofascial trigger points at different stages of recovery from injury in a rat model. *Acupunct Med.* 2017;35(6):445-451. doi:10.1136/acupmed-2016-011212
133. Vander Heide RS, Angelo JP, Altschuld RA, Ganote CE. Energy dependence of contraction band formation in perfused hearts and isolated adult myocytes. *Am J Pathol.* 1986;125(1):55-68.
134. Baker JH, Matsumoto DE. Adaptation of skeletal muscle to immobilization in a shortened position. *Muscle Nerve.* 1988;11(3):231-244. doi:10.1002/mus.880110308
135. Reddy AS, Reedy MK, Best TM, Seaber A V, Garrett WE. Restriction of the injury response following an acute muscle strain. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(3):321-327.
136. Lin W, Shuster S, Maibach HI, Stern R. Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(8):1157-1163. doi:10.1177/002215549704500813
137. K K, M L, J A, et al. Safranin O reduces loss of glycosaminoglycans from bovine articular cartilage during histological specimen preparation. *Histochem J.* 1996;28(2):99-107. doi:10.1007/BF02331414
138. Laskowski MB, Olson WH, Dettbarn WD. Ultrastructural changes at the motor end-plate

- produced by an irreversible cholinesterase inhibitor. *Exp Neurol.* 1975;47(2):290-306. doi:10.1016/0014-4886(75)90258-7
139. Laskowski MB, Olson WH, Dettbarn WD. Initial ultrastructural abnormalities at the motor end plate produced by a cholinesterase inhibitor. *Exp Neurol.* 1977;57(1):13-33. doi:10.1016/0014-4886(77)90041-3
140. Minamoto VB, Grazziano CR, De Fátima Salvini T. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. *Anat Rec.* 1999;254(2):281-287. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(19990201)254:2<281::AID-AR14>3.0.CO;2-Z
141. Xiao W, Liu Y, Luo B, et al. Time-dependent gene expression analysis after mouse skeletal muscle contusion. *J Sport Heal Sci.* 2016;5(1):101-108. doi:10.1016/j.jshs.2016.01.017
142. Liu QG, Huang QM, Liu L, Nguyen TT. Structural and functional abnormalities of motor endplates in rat skeletal model of myofascial trigger spots. *Neurosci Lett.* 2019;711:134417. doi:10.1016/j.neulet.2019.134417
143. Gerwin RD, Cagnie B, Petrovic M, Van Dorpe J, Calders P, De Meulemeester K. Foci of Segmentally Contracted Sarcomeres in Trapezius Muscle Biopsy Specimens in Myalgic and Nonmyalgic Human Subjects: Preliminary Results. *Pain Med.* 2020;21(10). doi:10.1093/pm/pnaa019
144. Shah JP, Gilliams EA. Uncovering the biochemical milieu of myofascial trigger points using in vivo microdialysis: An application of muscle pain concepts to myofascial pain syndrome. *J Bodyw Mov Ther.* 2008;12(4):371-384. doi:10.1016/j.jbmt.2008.06.006
145. Wang Z, Tang Z. Composition and Function of Extracellular Matrix in Development of Skeletal Muscle. In: *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body.* InTech; 2016. doi:10.5772/62645
146. Csapo R, Gumpenberger M, Wessner B. Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. *Front Physiol.* 2020;11:253. doi:10.3389/fphys.2020.00253
147. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. *DMM Dis Model Mech.* 2011;4(2):165-178. doi:10.1242/dmm.004077
148. Purslow PP. The Structure and Role of Intramuscular Connective Tissue in Muscle Function. *Front Physiol.* 2020;11:495. doi:10.3389/fphys.2020.00495
149. Van Ry PM, Fontelonga TM, Barraza-Flores P, Sarathy A, Nunes AM, Burkin DJ. ECM-related myopathies and muscular dystrophies: Pros and cons of protein therapies. *Compr Physiol.* 2017;7(4):1519-1536. doi:10.1002/cphy.c150033
150. Riso E-M, Kaasik P, Seene T. Remodelling of Skeletal Muscle Extracellular Matrix:

- Effect of Unloading and Reloading. In: *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*. InTech; 2016. doi:10.5772/62295
151. Morales MG, Cabello-Verrugio C, Santander C, Cabrera D, Goldschmeding R, Brandan E. CTGF/CCN-2 over-expression can directly induce features of skeletal muscle dystrophy. *J Pathol*. 2011;225(4):490-501. doi:10.1002/path.2952
 152. Dommerholt J, Hooks T, Chou LW, Finnegan M. Myofascial pain and treatment: Editorial. *J Bodyw Mov Ther*. 2019;23(3):521-531. doi:10.1016/j.jbmt.2019.06.009
 153. JR Dexter DS. Local twitch response in human muscles evoked by palpation and needle penetration of trigger point. *Arch Phys Med Rehabil*. 1981;62:521-522.
 154. Zhao M, Song B, Pu J, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN. *Nature*. 2006;442(7101):457-460. doi:10.1038/nature04925
 155. Sun YS, Peng SW, Cheng JY. In vitro electrical-stimulated wound-healing chip for studying electric field-assisted wound-healing process. *Biomicrofluidics*. 2012;6(3). doi:10.1063/1.4750486
 156. Von Euler H, Olsson JM, Hultenby K, Thörne A, Lagerstedt AS. Animal models for treatment of unresectable liver tumours: A histopathologic and ultra-structural study of cellular toxic changes after electrochemical treatment in rat and dog liver. *Bioelectrochemistry*. 2003;59(1-2):89-98. doi:10.1016/S1567-5394(03)00006-9
 157. Wemyss-Holden SA, Court FG, Morrison CP, et al. Palliation of pancreatic cancer using electrolytic ablation. *Surg Endosc Other Interv Tech*. 2003;17(2):207-211. doi:10.1007/s00464-002-9109-y
 158. Serway R. Física para ciencias e ingeniería. VOL.II. McGrawHill 2000.
 159. Bosque M, Rhys-jones L, Poveda-pagan E, Guerra-perez R. Alteration of needle tips with dry needling techniques. 2016;1(1):26-34.
 160. Lee S, Choi G-H, Lee CH, et al. Exploration of New Electroacupuncture Needle Material. 2012;2012:612545. doi:10.1155/2012/612545



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI