



## **PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS EN LA GENERACIÓN DE PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES**

**Marc Bosque Alberich**

**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.

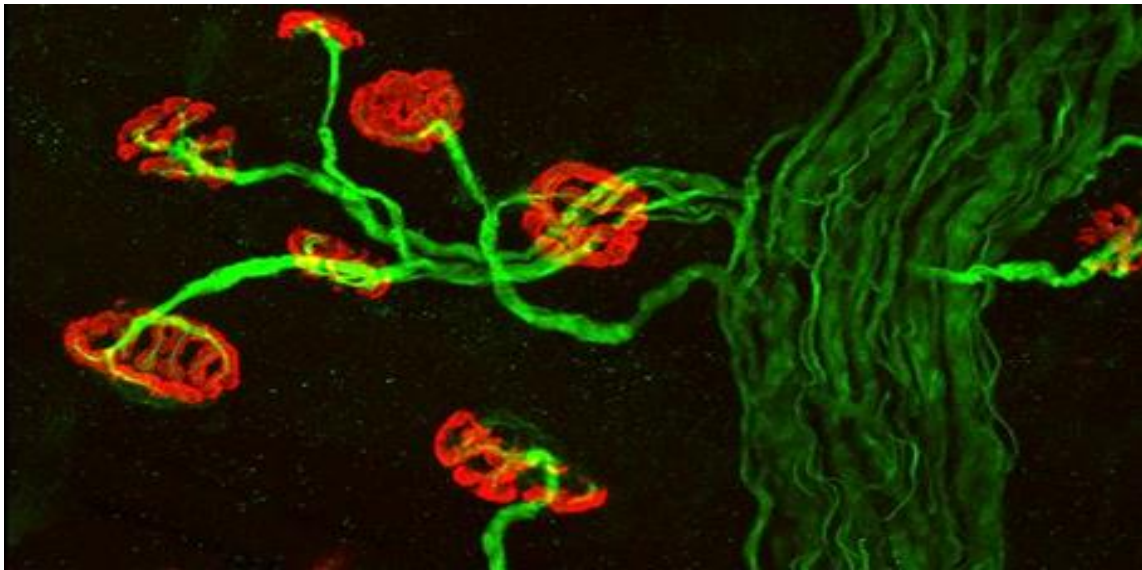


UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

# PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS EN LA GENERACIÓN DE PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES

---

Marc Bosque Alberich



TESIS DOCTORAL

2021

Microfotografía de la portada: Imagen de inmunofluorescencia de una arborización nerviosa intramuscular (verde) realizando contacto sináptico con las fibras musculares (rojo).



Marc Bosque Alberich

# **PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS EN LA GENERACIÓN DE PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES**

**TESIS DOCTORAL**

dirigida por:

Dr. Manel Santafé Martínez



**Unidad de Histología y Neurobiología  
Departamento de Ciencias Médicas Básicas**

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

Reus, 2021





HAGO CONSTAR que el presente trabajo titulado "PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS EN LA GENERACIÓN DE PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES", que presenta Marc Bosque Alberich, 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, 26 de abril de 2021

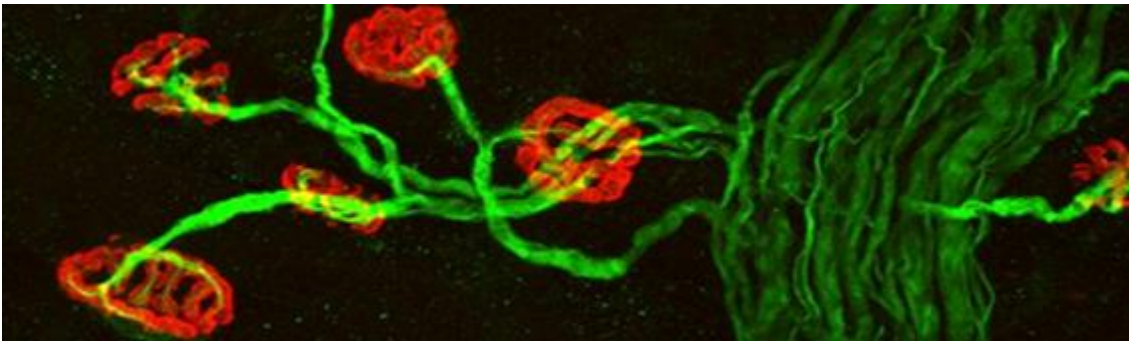
El director de la tesis doctoral

**Dr. Manel Santafé**





## AGRADECIMIENTOS





En estas líneas me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han participado a lo largo de la realización de esta tesis doctoral, y han creído en mí acompañándome durante todo el camino. Sin vuestro apoyo, este trabajo no hubiera sido posible.

En primer lugar, al Dr. Manel Santafé; por confiar en mí desde el principio hasta el final; por darme la oportunidad de trabajar en esta Unidad, por todo lo aprendido tanto a nivel profesional como a nivel personal todos estos años, por tu comprensión, paciencia, dedicación, ánimos y apoyo incondicional, en los buenos y en los no tan buenos momentos, no solamente como director de mi tesis, sino como persona, y lo más importante, como amigo. Tu carácter estricto y exigente, pero usado siempre para el bien, para obligar a que me supere día a día. Por ser un referente, por un lado, con un nivel tan alto, inalcanzable, admirable fuente de conocimientos, caja inagotable de recursos y experiencias, y a la vez, tan cercano y cálido con todos nosotros. Tus consejos y tu ayuda incansable siempre que la he necesitado, y tu absoluta implicación en todos los ámbitos, hacen que no pudiera haber encontrado un mejor sitio para crecer. Eternamente agradecido, Manel.

A la Dra. Teresa Colomina por tu amabilidad y preocuparte por mí; porque, gracias al apoyo que brindáis tanto tu como Manel, integrando a los clínicos curiosos como yo en el programa de doctorado, sois “culpables” del crecimiento y la expansión de la fisioterapia en el fantástico mundo de la investigación, y porque entre los dos habéis conseguido no solamente formar un nuevo grupo de trabajo y proyectos, sino también una pequeña familia.

También me gustaría agradecer su papel a todos los compañeros de laboratorio que he tenido.

A Ramón Margalef y Marc Sisquella, porque con vosotros empezó todo; gracias por todos esos buenos momentos que hemos pasado juntos en el LAB, por vuestras ironías y bromas que hicieron mucho más fácil el trabajo diario, y por compartir codo con codo la complejidad absoluta que presenta el mundo de la electrofisiología, y más para tres fisioterapeutas como nosotros. No cambiéis nunca, sois geniales.

A Pol Monclús por ser uno de mis motores durante el transcurso de esta tesis; gracias por tu complacencia, por dedicarme tu tiempo, no solamente en la universidad, sino en el Reus Deportiu y en la clínica, imposible de compaginar sin tu apoyo incondicional. Y a Albert Llavería, mi otro gran apoyo durante estos últimos meses, gracias por tu dedicación, por hacérmelo todo tan fácil, y por esta pasión que te

caracteriza en todo lo que haces y aprendes. Gracias a los dos por ayudarme en todo lo que he necesitado y por los ratos compartidos, y por muchos más años con gente así a mi alrededor.

A Aída, Grisel, Pati y Camila, ese fantástico equipo de becas Carolina, que llegaron al LAB como un elemento complementario del proyecto, y que, por su personalidad, se convirtieron en algo imprescindible en el camino recorrido; Aída y tus costumbres argentinas, Grisel y Pati, adentrándome en el mundo mejicano, y Camila, con tu ritmo brasileño, me ayudasteis todas a tener una perspectiva mejor del mundo, a entender las cosas bajo otro punto de vista y a comprender que el término “amistad” no entiende de fronteras. Aquí siempre tendréis una segunda casa, gracias por todos esos buenos momentos.

A Clara, David, Raquel, Fátima, Merche, Irina, Oihana, Laia, Judit, Pia, Marta, Carlos, Gemma, Mario, Claudia, Oriol, Guille, y Jordi; porque cada uno de vosotros, en mayor o menor medida, habéis puesto vuestro granito de arena para que pudiera cumplir mis objetivos. Gracias por vuestro trabajo, por los buenos momentos juntos, y por dar un poco más de color a nuestro laboratorio. Ha sido muy fácil trabajar a vuestro lado.

A todos los alumnos internos que habéis pasado por la Unidad en mis años de doctorado, y también a mis alumnos de prácticas; gracias por vuestra implicación y por vuestras ganas de aprender, por escucharme y por dejar que os pudiera transmitir y enseñar todo lo aprendido en esta bonita etapa de mi vida.

Gracias a todos/as por ser como sois, y porque con gente como vosotros/as, que, con dedicación altruista de su tiempo libre, priorizando el hecho de seguir haciendo grande nuestra profesión, investigando y estudiando nuevos avances en nuestro campo, se puede seguir teniendo fe en la evolución y el reconocimiento de la fisioterapia.

A la Dra. Neus Garcia, Dra. Maria Àngels Lanuza, Dr. Josep Tomás, y a todos los otros miembros del Departamento de Histología y Neurobiología de la facultad, Víctor, Laia, Anna, Laura, Erica, por vuestra atención, por vuestra consideración y vuestra ayuda siempre que la he necesitado. Muchas gracias por ponerle las cosas más fáciles a un clínico en un mundo de biólogos y químicos.

Al Dr. Nico Ortiz, por tu inestimable ayuda en el manejo del EMG, y por tu ayuda en la comprensión de mi proyecto, en relación con el fantástico ámbito de la Neurología. Eres un ejemplo como profesional y persona.

A Silvia y Jordi por vuestra disposición en ayudarme en todo lo que he necesitado, gracias por vuestra experiencia, paciencia y por dedicarme vuestro tiempo en la preparación de reactivos y de muestras, en la obtención de materiales y en el funcionamiento del laboratorio como técnicos. A Amparo, Esperanza y Juan, por toda la ayuda que me habéis prestado en todo momento con la logística de los animales. Al servicio científico-técnico del campus Sescelades, Mercè, Rita, y Mariana, por vuestro trabajo complementario tan necesario con la microscopía. A Antonio, Imma y todo el equipo de secretaría de la Unidad, por facilitarme todas las tareas tan complicadas que comporta la burocracia. Y a José Luis, a Joan, y a Montse, por vuestra amabilidad, y por allanarme las cosas con los problemas de las prácticas, los horarios, las llaves y las aulas. Sin todos vosotros, el trabajo hubiera sido mucho más difícil.

Finalmente agradecer a la Agencia de Gestión de ayudas Universitarias y de Investigación (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya, por la otorgación de la beca FI-DGR 16 que recibí, ya que gracias a este formato de subvenciones he podido disfrutar de una ayuda predoctoral imprescindible para el desarrollo completo de mi tesis y de mi proyecto de investigación.

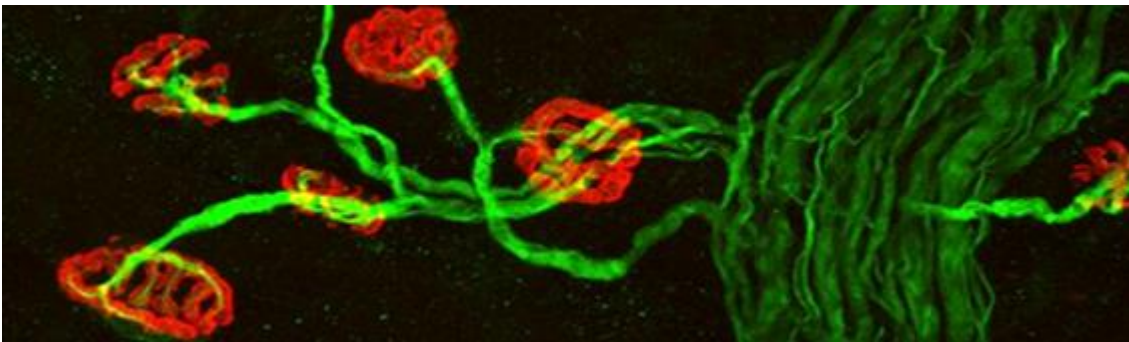
A parte de la URV, de la facultad y de todos aquellos elementos importantes de mi etapa predoctoral, me gustaría dar también las gracias a todas aquellas personas que forman parte de mi vida y que, día tras día, me dan apoyo incondicional.

A mis padres, Jordi y Montse, a mis hermanos, Albert y Roger, y especialmente a Carlota; en general, a mi familia, y especialmente a mis abuelos Min, Mima, Padrina y Padrí; a mis amigos del alma Ferran, Clara, Júlia, Bruna, Coti, Joan, Tati, Junco, Laura, Àlex, Aina, Carlos, Àngel, Billy, Vinu, Arnau, Kimu, Javi, Pol, Òscar, Aleix, gracias por ser el pilar fundamental de mi vida. Por creer en mí en todo momento, por depositar vuestra confianza, aunque no entendáis del todo mis locuras y mis pasiones. Por estar ahí, por vuestra constancia y perseverancia en las buenas, y en las malas, por vuestra bondad, sin pedir nada a cambio, por aguantar mi carácter, por darme ánimos y ayudarme a levantar y a seguir cada vez que la cuesta se acentuaba, y por ser, en definitiva, mi motor diario. Si he llegado hasta aquí también es gracias a vosotros y a vuestro empeño y esfuerzo en ayudarme a ser mejor persona.

¡Muchas gracias a todos por tanto!



# ÍNDICE







i.	ÍNDICE DE FIGURAS .....	1
ii.	ÍNDICE DE TABLAS.....	4
iii.	LISTADO DE ACRÓNIMOS .....	5
	RESUMEN.....	7
1.-	INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.-	ESTRÉS PSICOLÓGICO.....	13
1.2.-	ESTRÉS PSICOLÓGICO CRÓNICO.....	14
1.3.-	SÍNDROME DE DOLOR MIOFASCIAL Y PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES.....	16
1.4.-	ACTIVIDAD NEUROMUSCULAR Y DOLOR MUSCULAR.....	21
1.4.1.-	Conceptos básicos de la actividad neuromuscular.....	21
1.4.2.-	Neurotransmisión espontánea.....	23
1.4.3.-	Actividad neuromuscular y su relación con el dolor muscular.....	23
1.5.-	ESTRÉS PSICOLÓGICO Y SU RELACIÓN CON EL SDM COMO FUENTE DE DOLOR MUSCULAR.....	26
1.6.-	ESTRÉS PSICOLÓGICO COMO FACTOR DE GENERACIÓN Y PERPETUACIÓN DE PGM.....	29
2.-	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	32
2.1.-	HIPÓTESIS.....	34
2.1.1.-	Hipótesis general.....	34
2.1.2.-	Hipótesis específicas.....	34
2.2.-	OBJETIVOS.....	34
2.2.1.-	Objetivo general.....	34
2.2.2.-	Objetivos específicos.....	34
3.-	MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
3.1.-	ANIMALES.....	38
3.2.-	MODELO EXPERIMENTAL.....	39
3.2.1.-	Justificación del uso del músculo LAL.....	39
3.2.2.-	Justificación del uso del complejo muscular tríceps sural.....	40
3.3.-	DISECCIÓN DEL MÚSCULO LAL.....	40
3.4.-	PROCEDIMIENTOS PARA PROVOCAR ESTRÉS.....	43
3.4.1.-	Inmovilización.....	43
3.4.2.-	Prueba de natación forzada o de Porsolt (FST, <i>forced swim test</i> ).....	44
3.4.3.-	Privación de comida y agua.....	46
3.4.4.-	Aislamiento social en jaula metabòlica.....	46

<b>3.4.5.- Ultrasonidos.....</b>	<b>47</b>
<b>3.4.6.- Exposición a estresores secuenciales.....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE ANIMALES.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.1- Exclusión durante los procedimientos estresores.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.2- Exclusión durante la aplicación de técnicas electrosisiológicas.....</b>	<b>49</b>
<b>3.6.- REGISTRO INTRACELULAR.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.1.- Conceptos básicos.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.2.- Componentes del equipo de electrofisiología utilizado.....</b>	<b>50</b>
3.6.2.1.- <i>Electrodo de borosilicato para registro intracelular.</i> .....	51
3.6.2.2.- <i>Electrodo de plata de registro.</i> .....	51
3.6.2.3.- <i>Electrodo de referencia extracelular.</i> .....	52
3.6.2.4.- <i>Multivoltímetro.</i> .....	52
3.6.2.5.- <i>Tabla digitalizadora (DIGIDATA 1322<sup>a</sup>, Interface, Axon Instrument Inc., Weatherford, TX, EUA).</i> .....	52
3.6.2.6.- <i>Soft informático (Axoscope 10.2)</i> .....	52
3.6.2.7.- <i>Amplificador.</i> .....	53
<b>3.6.3.- Procedimiento para el registro electrofisiológico intracelular. ....</b>	<b>53</b>
<b>3.6.4.- Parámetros evaluados.....</b>	<b>56</b>
3.6.4.1.- <i>Potencial de membrana</i> .....	56
3.6.4.2.- <i>Frecuencia de los mEPPs.</i> .....	56
3.6.4.3.- <i>Amplitud de los mEPPs.</i> .....	56
<b>3.6.5.- Análisis estadístico. ....</b>	<b>57</b>
<b>3.7.- REGISTRO ELECTROMIOGRÁFICO.....</b>	<b>58</b>
<b>3.7.1.- Conceptos básicos.....</b>	<b>58</b>
<b>3.7.2.- Composición del equipo de electromiografía utilizado.....</b>	<b>60</b>
3.7.2.1.- <i>Electrodo de aguja monopolar (Natus Manufacturing Limited)</i> .....	60
3.7.2.2.- <i>Electrodo de referencia.</i> .....	61
3.7.2.3.- <i>Equipo de electromiografía.</i> .....	61
3.7.2.4.- <i>Contador de frecuencia.</i> .....	61
<b>3.7.3.- Procedimiento de registro electromiográfico. ....</b>	<b>63</b>
<b>3.7.4.- Parámetros evaluados.....</b>	<b>65</b>
3.7.4.1.- <i>Número de áreas con ruido de placa</i> .....	65
3.7.4.2.- <i>Frecuencia de los eventos en el ruido de placa</i> .....	65
<b>3.7.5.- Análisis estadístico. ....</b>	<b>66</b>
<b>3.7.6.- Artefactos más comunes en la electrofisiología. ....</b>	<b>67</b>
<b>3.7.6.1.- Artefactos debidos a los dispositivos electrónicos. ....</b>	<b>67</b>
<b>3.7.6.2.- Artefactos de movimiento. ....</b>	<b>67</b>

<b>3.7.6.3.- Ruido electromagnético.....</b>	<b>68</b>
<b>3.7.6.4.- Señal cruzada (“cross-talk signal”). .....</b>	<b>68</b>
<b>3.8.- TÉCNICA PAS-ALCIÁN. ....</b>	<b>68</b>
<b>4.- RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1.- ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1.1.- Electrofisiología de registro intracelular.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1.2.- Electromiografía. ....</b>	<b>74</b>
<b>4.1.3.- Tinción PAS-ALCIÁN.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2.- ESTRÉS POR NATACIÓN FORZADA O PRUEBA DE PORSOLT (FST, forced swim test).....</b>	<b>77</b>
<b>4.2.1.- Electrofisiología de registro intracelular.....</b>	<b>78</b>
4.2.1.1.- FST a 37°C. ....	78
4.2.1.2.- Habitación previa al FST adaptado a 21°C.....	79
4.2.1.3.- FST a 21°C. ....	79
<b>4.2.2.- Electromiografía. ....</b>	<b>81</b>
4.2.2.1.- FST a 37°C. ....	81
4.2.2.2.- Habitación previa al FST a 21°C.....	83
4.2.2.3.- FST adaptado a 21°C.....	84
<b>4.2.3.- Tinción PAS-ALCIÁN.....</b>	<b>86</b>
<b>4.3.- ESTRÉS POR PRIVACIÓN DE COMIDA Y AGUA.....</b>	<b>87</b>
<b>4.3.1.- Electrofisiología de registro intracelular.....</b>	<b>87</b>
<b>4.3.2.- Electromiografía. ....</b>	<b>88</b>
<b>4.3.3.- Tinción PAS-ALCIÁN.....</b>	<b>90</b>
<b>4.4.- ESTRÉS MEDIANTE AISLAMIENTO SOCIAL.....</b>	<b>91</b>
<b>4.4.1.- Electrofisiología de registro intracelular.....</b>	<b>91</b>
<b>4.4.2.- Electromiografía. ....</b>	<b>93</b>
<b>4.5.- ESTRÉS POR ULTRASONIDOS.....</b>	<b>97</b>
<b>4.5.1.- Electrofisiología de registro intracelular.....</b>	<b>97</b>
<b>4.5.2.- Electromiografía. ....</b>	<b>99</b>
<b>4.6.- EXPOSICIÓN A ESTRESORES SECUENCIALES.....</b>	<b>103</b>
<b>4.6.1.- Electrofisiología de registro intracelular.....</b>	<b>103</b>
<b>4.6.2.- Electromiografía. ....</b>	<b>104</b>
<b>4.6.3.- Tinción PAS-ALCIÁN.....</b>	<b>106</b>
<b>5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>108</b>
<b>5.1.- REGISTRO INTRACELULAR Y ELECTROMIOGRAFÍA EN EL ESTUDIO DE LOS PGM. ....</b>	<b>110</b>
<b>5.2.- TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....</b>	<b>114</b>

<b>5.3.- MODELO ANIMAL DEL ESTRÉS AGUDO. ....</b>	<b>115</b>
<b>5.4.- ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN.....</b>	<b>116</b>
<b>5.5.- ESTRÉS POR FST (<i>FORCED SWIM TEST</i>).....</b>	<b>119</b>
<b>5.6.- ESTRÉS POR PRIVACIÓN DE ALIMENTO Y AGUA. ....</b>	<b>123</b>
<b>5.7.- ESTRÉS POR AISLAMIENTO SOCIAL. ....</b>	<b>128</b>
<b>5.8.- ESTRÉS POR ULTRASONIDOS.....</b>	<b>131</b>
<b>5.9.- BÚSQUEDA DEL ESTRÉS CRÓNICO IDÓNEO.....</b>	<b>133</b>
<b>5.10.- ESTRÉS CRÓNICO POR COMBINACIÓN DE ESTRESORES.....</b>	<b>136</b>
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>140</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>144</b>

## i. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.1. Microfotografía de microscopía electrónica de un nodo de contracción secundario a la aplicación de neostigmina.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura I.2. Microfotografía de un PGM visualizado con PAS-Alcián. Imagen obtenida 30 minutos después de la administración de neostigmina subcutánea. ....</b>	<b>21</b>
<b>Figura I.3. Esquema de un EPP (end plate potential).....</b>	<b>22</b>
<b>Figura M.1. Extracción del músculo LAL del ratón.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura M.2. Disección del músculo LAL.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura M.3. Jaula estándar para inmovilización del ratón..</b>	<b>44</b>
<b>Figura M.4. Prueba adaptada de natación forzada (FST, forced swim test). ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura M.5. Desglose del protocolo combinado utilizado para la aplicación del “Sumatorio de estrés diverso”. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura M.6. Sistema básico d’electrofisiología para el registro intracelular..</b>	<b>53</b>
<b>Figura M.7. Registros intracelulares de mEPPs..</b>	<b>55</b>
<b>Figura M.8. Registro electromiográfico.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura M.9. Representación de un electrodo de aguja monopolar (1) y un electrodo de aguja concéntrico (2), juntamente con la distribución esquemática de las fibras musculares que pertenecen a una unidad motora..</b>	<b>61</b>
<b>Figura M.10. Sistema de electromiografía.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura M.11. Protocolo de registro EMG.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura R.1. Estrés por inmovilización. Registro intracelular.....</b>	<b>74</b>
<b>Figura R.2. Estrés por inmovilización. Áreas con ruido de placa..</b>	<b>75</b>
<b>Figura R.3. Estrés por inmovilización. Frecuencia de eventos de ruido de placa..</b>	<b>76</b>
<b>Figura R.4. Estrés por inmovilización. Tinción PAS-Alcián.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura R.5. Estrés por “Forced Swimming test” adaptado a 37°C..</b>	<b>78</b>
<b>Figura R.6. Habitación al “Forced Swimming test” a 21°C..</b>	<b>79</b>
<b>Figura R.7. Estrés por “Forced Swimming test” a 21°C.....</b>	<b>80</b>
<b>Figura R.8. Estrés por “Forced Swimming test” a 37°C: Áreas con ruido de placa. ....</b>	<b>82</b>
<b>Figura R.9. Estrés por “Forced Swimming test” a 37°C: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.....</b>	<b>82</b>

<b>Figura R.10. Estrés por habituación al “Forced Swimming test” adaptado a 21°C: Áreas con ruido de placa..</b>	<b>83</b>
<b>Figura R.11. Estrés por habituación al “Forced Swimming test” adaptado a 21°C: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura R.12. Estrés por “Forced Swimming test” a 21°C: Áreas con ruido de placa..</b>	<b>85</b>
<b>Figura R.13. Estrés por “Forced Swimming test” adaptado a 21°C: Frecuencia de aparición de ruido de placa.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura R.14. Tinción PAS-Alcián. Estrés por “Forced Swimming test” adaptado a 21°C.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura R.15. Estrés por “Privación de comida y agua” durante 24 horas..</b>	<b>88</b>
<b>Figura R.16. Estrés por privación de comida y agua durante 24 horas: Áreas con ruido de placa..</b>	<b>89</b>
<b>Figura R.17. Estrés por privación de comida y agua durante 24 horas: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa..</b>	<b>90</b>
<b>Figura R.18. Estrés por aislamiento mediante “jaula metabólica” durante 24 horas. Registro intracelular..</b>	<b>92</b>
<b>Figura R.19. Estrés por aislamiento social mediante “jaula metabólica” durante 5 días consecutivos.....</b>	<b>93</b>
<b>Figura R.20. Estrés por aislamiento social durante 24 horas: Áreas con ruido de placa..</b>	<b>94</b>
<b>Figura R.21. Estrés por aislamiento social durante 24 horas: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa..</b>	<b>95</b>
<b>Figura R.22. Estrés por aislamiento social durante 5 días consecutivos: Áreas con ruido de placa..</b>	<b>96</b>
<b>Figura R.23. Estrés por aislamiento social durante 5 días consecutivos: frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura R.24. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 3 horas.....</b>	<b>98</b>
<b>Figura R.25. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 24 horas.....</b>	<b>99</b>
<b>Figura R.26. Estrés por ultrasonidos durante 3 horas: Áreas con ruido de placa..</b>	<b>100</b>
<b>Figura R.27. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 3 horas: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa..</b>	<b>101</b>
<b>Figura R.28. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 24 horas: Áreas con ruido de placa..</b>	<b>102</b>
<b>Figura R.29. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 24 horas: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa..</b>	<b>102</b>

<b>Figura R.30. Exposición a estresores secuenciales durante 8 días: registro intracelular..</b> .....	104
<b>Figura R.31. Exposición a estresores secuenciales durante 8 días: Áreas con ruido de placa..</b> .....	105
<b>Figura R.32. Exposición a estresores secuenciales durante 8 días. Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa..</b> .....	106
<b>Figura R. 33. Exposición a estresores secuenciales. Tinción PAS-Alcián..</b> .....	107

## ii. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla M. 1. Materiales y soluciones utilizadas durante los experimentos electrofisiológicos.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla M. 2. Materiales y soluciones utilizadas en los procedimientos electromiográficos.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabla M. 3. Materiales y soluciones utilizadas durante la aplicación de las técnicas morfológicas.....</b>	<b>70</b>

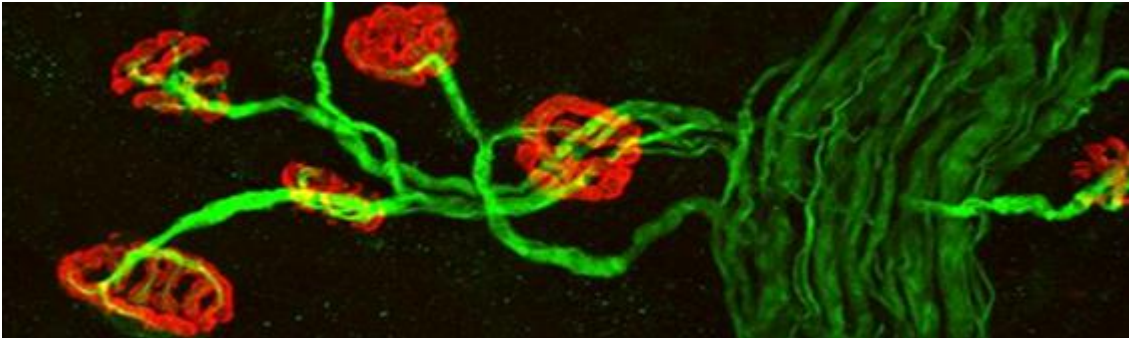


### iii. LISTADO DE ACRÓNIMOS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AEE</b>	Actividad Eléctrica Espontánea
<b>EFG</b>	Electrofisiología
<b>EMG</b>	Electromiografía
<b>EPPs</b>	End Plate Potential
<b>GAGs</b>	Glicosaminoglicanos
<b>Hz</b>	Hercios
<b>LAL</b>	Levator auris longus
<b>mEPPs</b>	miniature End Plate Potential
<b>MeSH</b>	Medical Subject Headings
<b>mV</b>	milivoltios
<b>NTG</b>	Neostigmina
<b>PGM</b>	Puntos Gatillo Miofasciales
<b>SDM</b>	Síndrome de Dolor Miofascial
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>FST</b>	Forced swim test
<b>TBE</b>	Tribromoethanol



## RESUMEN





Los puntos gatillo miofasciales (PGM) están causados por un conjunto de síntomas sensibles, motores y autonómicos, y constituyen el síndrome de dolor muscular miofascial (SDM). Aunque no hay evidencias, se ha propuesto el estrés como generador y perpetuador del SDM. La teoría fisiopatológica más aceptada propone que los PGM involucran un incremento de ACh en los músculos afectados.

**Objetivo:** El objetivo de este estudio ha sido evaluar la relación entre el estrés y la generación de PGM.

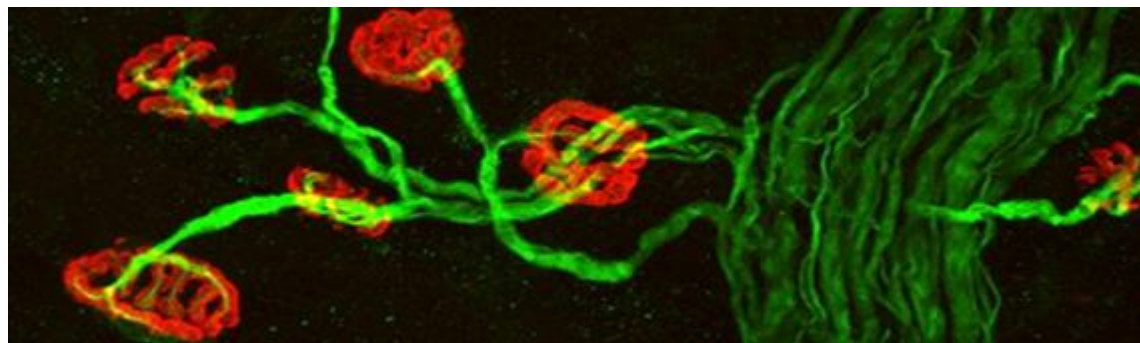
**Métodos:** Se analizaron 5 factores estresantes agudos (inmovilización, natación forzada, privación de comida y agua, aislamiento social y ultrasonidos) en ratones macho de 4-6 semanas de edad. Posteriormente, estos tipos de estrés fueron combinados para generar un modelo de estrés crónico. El estudio de la liberación de ACh se evaluó antes y después de la aplicación del estrés mediante: registro intracelular de neurotransmisión espontánea (mEPPs) y registro electromiográfico de ruido de placa. Para el estudio morfológico, se realizó la técnica PAS-Alcián con el fin de ver PGM.

**Resultados:** En cada uno de los factores estresantes se obtuvo un incremento en la frecuencia de los mEPPs y en las áreas con ruido de placa inmediatamente después al tratamiento que se mantuvo elevado hasta los 5 días siguientes y se normalizó a la semana. Con el estrés crónico, se obtuvo un incremento mucho mayor que se mantuvo durante 15 días. Sin embargo, la técnica de PAS-Alcián no mostró PGM en ninguno de los períodos post-tratamiento estudiados.

**Conclusión:** El estrés, tanto en su forma aguda como crónica, es insuficiente para generar PGM actuando como factor aislado, aunque induce algunos de sus signos característicos electrofisiológicos y electromiográficos, convirtiéndose en un elemento relevante en la generación, perpetuación y/o cronificación del SDM.



## 1.- INTRODUCCIÓN







## 1.1.- ESTRÉS PSICOLÓGICO.

El estrés es uno de los denominadores comunes en la mayor parte de patologías crónicas de la sociedad occidental actual. Presente en gran parte de los comportamientos sociales, es una respuesta fisiológica que sirve como mecanismo mediador entre cualquier estresor (que se entiende como condición de peligro percibido que amenaza la supervivencia del individuo) y su efecto en el organismo. La capacidad del organismo de responder ante una situación de estrés constituye uno de los mecanismos más básicos existentes en los mamíferos. La respuesta al estrés involucra a todo un sistema muy complejo, evolucionado y extremadamente eficiente y coordinado, modulado gracias a la precisa actuación de varios niveles del sistema nervioso central (SNC) (Sapolsky y Meaney, 1986; Joëls y Baram, 2009). La premisa para que esto ocurra es, lógicamente, la percepción de un estímulo estresante, y que esta situación se perciba como amenazante para el organismo. Es el cerebro, en un primer momento, el encargado de reclutar la función de un conjunto de distintos circuitos neuronales, con el objetivo de mantener en todo momento la integridad fisiológica, incluso en las condiciones más adversas posibles (Ulrich-Lay y Herman, 2009). De todas formas, no todos los estresores se procesan mediante la participación de las mismas redes neuronales. En función de si el estresor es psicológico o físico, se producirá una actividad celular distinta, y serán procesados de forma diferenciada por el cerebro, aunque esta actividad en algunas ocasiones se puede superponer. Aquellos estímulos que producen alteraciones reales en el estado fisiológico del organismo, como puede ser, por ejemplo, una herida, se consideran estresores físicos. Mientras que, aquellos otros que amenazan el estado actual del individuo, y se perciben en forma de condición anticipatoria al peligro, como, por ejemplo, la detección de señales relacionadas con un depredador, constituyen al estrés psicológico (Dayas y cols., 2001). El estrés emocional o psicológico es una forma de estrés provocado por un procesamiento negativo de la experiencia mental y se ha valorado siempre como uno de los grandes precursores en la alteración de las funciones fisiológicas normales y generador de múltiples enfermedades y patologías neuropsiquiátricas. Aunque, por su naturaleza, aquellos factores estresantes que sean predominantemente físicos tienen más probabilidades de desembocar en forma de respuestas de estrés autónomas, los factores estresantes psicológicos terminan provocando respuestas de estrés tanto físicas como cognitivas (Skoluda y cols., 2015).

Hay una escasa evidencia entre la relación de los factores psicosociales y las enfermedades musculoesqueléticas. Probablemente, debido a la fuerte correlación entre estos factores psicosociales y la carga física, y también a las dificultades que

existen para medir las diferentes variables presentes en este tipo de condición. De todas formas, los síntomas del estrés muy a menudo se asocian con disfunciones musculares y, por lo tanto, existe una contribución en el desarrollo fisiopatológico (Bongers y cols., 1993).

La susceptibilidad al estrés emocional se considera comúnmente como un rasgo humano específico que es difícil de modelar en otras especies. Reconociendo que el estrés emocional es una construcción multidimensional, también presente en roedores, es necesaria una combinación de medidas bioquímicas, clínicas y de comportamiento para su correcta detección (Ramos y Mormède, 1998).

De todas formas, hasta el momento, los modelos animales para estudiar debidamente el estrés psicológico se han visto afectados por las limitaciones inherentes a la condición animal (Kala y cols., 2016). De hecho, está probado que el estrés psicofísico, tiene mucha más repercusión en el comportamiento del dolor que el uso de un estresor psicológico puro (La Porta y Tappe-Theodor, 2020) y seguramente tenga un papel mucho más relevante también en la involucración del estrés respecto a la generación y/o mantenimiento de los puntos gatillo miofasciales (PGM).

Los factores estresantes se pueden agrupar en 3 categorías básicas: estresores psicológicos que pueden estar basados en una respuesta aprendida en base a la amenaza de una condición adversa, como por ejemplo la ansiedad (Arborelius y cols, 1999); factores de estrés que implican un estímulo físico con un fuerte componente psicológico asociado, tales como la inmovilización (Barnum y cols., 2007); y agentes estresores que amenazan la homeostasis (como el sangrado, el ejercicio, o la exposición al calor; Heruti y cols., 2018).

El estrés, independientemente de las causas que lo precedan, puede presentarse en dos formas: aguda o crónica (Niddam y cols., 2008).

## **1.2.- ESTRÉS PSICOLÓGICO CRÓNICO.**

Una característica común de la mayoría de las patologías crónicas más prevalentes es la posible interacción de múltiples factores, genéticos y no genéticos, que, con el tiempo, acaban traducéndose en la manifestación de los signos y síntomas de la propia patología. Aunque hoy en día, gracias a la epidemiología es posible detectar e identificar específicamente la mayoría de estos factores de riesgo que pueden contribuir en la aparición, duración y gravedad patológica, es prácticamente imposible predecir cuál es la combinación de factores de riesgo que terminará comportando la manifestación final. De todas formas, sí que se sabe la

relevancia de la exposición crónica a situaciones estresantes como factor de riesgo ambiental de patología, y se empieza a investigar su compleja interacción en la participación de las patologías.

Las especies animales más utilizadas para la investigación del estrés crónico son los roedores y los primates. Estos últimos se utilizan para modelar patologías específicas relacionadas con un desarrollo cerebral superior (como es el caso de la depresión). Los primates tienen la gran ventaja evidente por su estrecha relación con la especie humana, incluyendo similitudes por lo que se refiere a la dominancia del comportamiento y en el uso de estresores sociales muy parecidos. De todas formas, el principal inconveniente de estudiar con este tipo de animales sigue siendo la poca disponibilidad de animales de prueba, básicamente por los elevados costes de mantenimiento y por los problemas éticos que generan. Para poder evitar estas limitaciones, el uso de roedores se ha convertido en la alternativa más aceptada para estudiar los mecanismos fisiopatológicos del estrés crónico (Schmidt y cols., 2008).

Normalmente, los modelos de estrés crónico se utilizan para el análisis de los efectos patológicos del propio estrés crónico como factor de riesgo, muy a menudo en el contexto relacionado con el desarrollo de trastornos y enfermedades afectivas conocidas como la depresión (Willner, 1997), o la ansiedad (Arborelius y cols., 1999). La mayoría de estas aproximaciones experimentales se realizan mediante la aplicación de diferentes agentes estresores y se evalúan cambios conductuales que puedan servir como criterios para entender el origen de este estrés. Pero hasta el momento no existe en la bibliografía ningún diseño específico para poder estudiar analíticamente posibles cambios que se puedan desarrollar a nivel neuromuscular y que podrían tener una relación con la generación del dolor muscular. En cambio, sí está ampliamente documentado que la aplicación de nuevos estímulos en roedores produce un patrón de reacciones defensivas comparables a las inducidas por situaciones amenazantes o que pueden provocar ansiedad (Russell, 1973; Blanchard y cols., 1974). De hecho, los entornos desconocidos son capaces de provocar distintos tipos de cambios conductuales y fisiológicos en los animales como, por ejemplo, inhibición de las secuencias conductuales, o signos de reacciones emocionales fuertes como aumento de la frecuencia cardíaca, erizamiento de la piel, micción y/o defecación, o niveles altos de corticoesteroides en plasma (Archer, 1973). De todas formas, se ha demostrado que estos cambios y estas respuestas no son inducidas por la novedad aisladamente, sino por el hecho de que los animales tengan que enfrentarse artificialmente a nuevos estímulos, y se les impide mostrar respuestas neofóbicas normales (Misslin y Cigrang, 1986). Este dato lleva a pensar que, si se puede generar una secuencia de factores estresores agudos, debidamente

predispuestos, de manera que limiten la capacidad de adaptación y habituación por parte del animal, se puede terminar convirtiendo en un modelo de estrés crónico lo suficientemente específico para poder evaluar, en las condiciones adecuadas, cambios en la actividad muscular presente.

### **1.3.- SÍNDROME DE DOLOR MIOFASCIAL Y PUNTOS GATILLO MIOFASCIALES.**

El síndrome de dolor miofascial constituye una de las causas de dolor muscular más habituales. El concepto se encuentra incorporado en el “Medical Subject Headings” (MeSH) y está considerado como un patrón de dolor muscular que puede encontrarse en numerosas regiones del cuerpo. Su cuadro clínico se asocia a bandas tensas el músculo afectado que contienen puntos claramente palpables y sensibles a la presión conocidos como puntos gatillo miofasciales (PGM) (Simons y cols., 2002a). Estos puntos son nódulos hiperirritables, dolorosos a la compresión y, cuando son convenientemente estimulados, pueden evocar dolor referido y ser responsables de generar una serie de disfunciones motoras (acortamiento, debilidad, fatigabilidad o descoordinación), sensitivas (variaciones del umbral a la presión, disestesias, parestesias o alodinas) o autonómicas (respuestas vasovagales, sudoración o mareos, entre otros; Simons, 2004). Su mecanosensibilidad, unido a su capacidad de producir dolor referido, constituyen al PGM como una fuente persistente de aferencias nociceptivas que lo proponen como un posible foco de sensibilización, tanto periférica como central (Dommerholt, 2011). A nivel histológico, en el miocito se presentan en forma de nodo de contracción localmente a la zona próxima a un contacto sináptico, constituyendo el que se denomina como “sitio activo” (*loci activo*).

Existen varios estudios que han tratado de visualizar y cuantificar los datos de los PGM utilizando tecnología avanzada. Por ejemplo, con electromiografía. El primer estudio electromiográfico lo encontramos en Weeks y Travell (1957) que describieron cambios en la actividad espontánea en un trapecio respecto a otras zonas adyacentes del mismo músculo. Más adelante, Hubbard y Berkoff (1993) identificaron, en la zona característica de un PGM, dos tipos de potenciales eléctricos diferentes, e independientes entre sí. Unos de baja amplitud (10  $\mu$ V – 80  $\mu$ V), normales, y otros de alta amplitud (100  $\mu$ V - 600  $\mu$ V), a los que atribuyeron como característica de los propios PGM. Estas conclusiones se perfeccionaron mediante registros más precisos (Brown y Varkey, 1981), con una amplificación y velocidad de barrido mucho mayor que la usada por sus predecesores, y determinaron que existían dos componentes a tener en cuenta dentro de la actividad eléctrica (Gerwin, 1994). Por un lado, unos

potenciales de espiga intermitentes de alta amplitud y sin patrón específico. Por otro lado, un ruido de placa de baja amplitud (alrededor de 60  $\mu$ V) persistentemente durante la todo el registro en el sitio activo del músculo, y al que denominaron actividad eléctrica espontánea (AEE). Definieron el sitio activo (loci activo) como área bien delimitada de acumulación de placas motoras disfuncionales. Existen varios estudios que indican que el ruido de placa procede de una placa motora funcionalmente alterada (Liley, 1956; Ito y cols., 1974; Ertekin y cols., 1996). De todas formas, gran parte de la neurofisiología reconoce esta actividad como potenciales normales de placa motora. Por ejemplo, Kimura, en su libro sobre electrodiagnóstico (Kimura, 1989), y basándose en estudios realizado previamente (Wiederholt, 1968) apoya esta idea. Este punto de vista también está respaldado por otros autores (Durette y cols., 1991). En conjunto, estas interpretaciones siguen siendo un tema de debate actualmente.

La AEE en forma de ruido de placa no es la única forma de actividad eléctrica, existen además las espigas. Estas se originan en el sitio activo y constituyen potenciales de acción de la célula muscular inervada por su placa motora correspondiente. Este hecho se encuentra corroborado por la mayoría de los estudios neurofisiológicos (Kimura, 1989). Este tipo de actividad eléctrica se asocia a los potenciales de placa evocados (*end plate potentials*, EPPs) espontáneos. Los EPPs aparecen por la sumación de varios potenciales de placa espontáneos en miniatura (*miniature end plate potentials*, mEPPs) hasta desencadenar el potencial de acción (Buchthal y Rosenfalck, 1966). Electromiográficamente se registran como espigas bifásicas de un tamaño bastante más elevado que el ruido de placa (a menudo con un voltaje 10 veces superior). Una de las explicaciones más simples sobre su aparición es la de un potencial axonal activado por la irritación causada por la propia inserción con el electrodo de aguja utilizado (Dumitru, 1995). También se propone el hecho que la irritación mecánica del terminal nervioso pueda terminar generando un efecto acumulativo importante, a partir del aumento de la frecuencia de los mEPPs hasta el punto de originar EPPs y registrarlos en forma de espiga. Sin embargo, no existen actualmente datos que confirmen estas irritaciones mecánicas. Al contrario, es sabido que la irritación mecánica de una rama del nervio motor producida por el electrodo de aguja puede causar lesiones y potenciales de actividad espontánea, pero raramente estos aparecen de forma rítmica y sostenida (Wall y cols., 1974). Además, el patrón producido en este caso lesional está claramente descrito (Macefield, 1998) como de denervación y no corresponde al formato de los registros electromiográficos obtenidos en un sitio activo del músculo. De hecho, existen algunos autores (Partanen y cols., 2010) que indican que el SDM podría representar la activación de un arco de reflejo

espinal, y que, en esta situación, las espigas tendrían un papel fundamental, ya que corresponderían a los potenciales de acción derivados de este reflejo. Incluso se baraja la posibilidad que estas espigas sean potenciales de acción obtenidos de las fibras musculares intrafusales (Partanen y cols., 2010). De todas formas, hasta el momento no se ha podido corroborar completamente ninguna de estas teorías.

El ruido de placa forma parte de la terminología usada habitualmente en el campo de la neurología pese que no se ha definido como signo clínico específico para determinar el estado de la salud neuromuscular. De todas formas, existen estudios como el de Maselli (1997) que confirman que el análisis de las alteraciones detectadas en este ruido de placa terminal puede suponer una forma particularmente útil para identificar síndromes congénitos miasténicos que presentan una función alterada de la acetilcolinesterasa. Paralelamente, existen estudios que evaluaron los cambios ocurridos en la unión neuromuscular posteriormente a la inyección de neurotoxina botulínica tipo A, y que provocaron la desaparición del ruido de placa (Van Putten y cols., 2002). Este tipo de datos descritos sugieren, de forma convincente, que el ruido de placa aparece a causa de la neurotransmisión espontánea muscular.

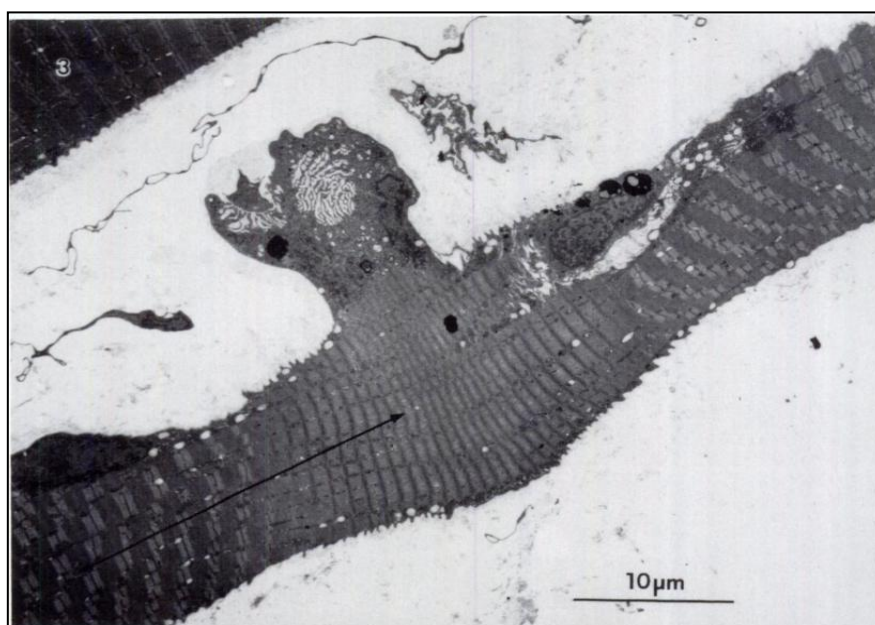
La electromiografía no ha sido el único procedimiento de diagnóstico utilizada, en la bibliografía se pueden encontrar otras investigaciones mediante electrofisiología (Margalef y cols., 2019), resonancia magnética, elastografía, sonoelastografía o ecografía Doppler (Ballyns y cols., 2011; Turo y cols., 2013). Otros estudios exploran la viabilidad de usar estas técnicas para identificar y cuantificar la naturaleza de las bandas tensas miofasciales, y aunque la muestra es limitada, los hallazgos obtenidos sugieren que se pueden llegar a medir las asimetrías presentes en el tono muscular (Chen y cols., 2007). Con todo, estos elementos permiten evaluar el efecto del tratamiento aplicado en un PGM e intentan aproximar un diagnóstico cuantitativo del SDM, acercando así un poco más la ciencia con la intervención clínica de este síndrome tan peculiar.

La elevada incidencia clínica de los PGM en humanos ha sido motivo de estudio desde hace años (Sola y cols., 1955; Skootsky y cols., 1989; Lucas y cols., 2010); de todas formas, aunque muchos estudios se centran en demostrar la prevalencia de los síntomas y los signos que rodean a este síndrome, hay muy poca evidencia que se focalice con los mecanismos, con sus bases neurofisiológicas y con los detonantes que pueden activarlos. Durante los últimos años, han surgido varias posibilidades fisiopatológicas alrededor del PGM y del SDM en general. Desde la participación de los husos musculares (Hubbard y Berkoff, 1993; Ge y cols., 2006), aumento de la actividad simpática (Shah y cols., 2008; Ribot-Ciscar y cols., 2000), considerarlo como una patología central (Arendt-Nielsen y cols., 2008; Mense y

Gerwin, 2010), ya sea por la sensibilización central como causa o como factor perpetuador, y basándose en su relación con el aumento del tono muscular (Falla y Farina, 2008), o un posible origen radiculopático, en el que se postularía la causa neurológica primaria y a los PGM como fenómenos secundarios (Quintner y Cohen, 1994; Gunn, 1997). Todas estas posibilidades se sustentan por estudios con un bajo rigor científico. Hasta la actualidad, la hipótesis más aceptada que describe la fisiopatología de los PGM es la propuesta por Simons el año 1995, conocida como hipótesis integrada (Simons, 1995; Gerwin y cols., 2004). En ella, el principal involucrado es la liberación anómalamente elevada de acetilcolina (ACh) en varias sinapsis neuromusculares vecinas. Eso provoca su acumulación en las hendiduras sinápticas y, a través de una cascada de eventos, termina originando el nodo de contracción subsináptico en el miocito (Gerwin y cols., 2004). El conjunto de estos nodos de contracción serían los que se palparían como PGM. El primer intento de imagen de un nodo de contracción subsináptico fue obtenido por Simons y Stolov (1976), en músculo *gracillis* de perro y aunque fue un hallazgo pionero, la imagen de microscopía óptica era de muy baja resolución e insuficiente para poder realizar una correcta descripción de esta estructura. Aunque esto ha evolucionado, y actualmente encontramos publicaciones potentes con las que se han obtenido imágenes compatibles con lo que pueden ser agrupaciones de PGM, todavía no es posible poder visualizar nodos de contracción subsinápticos de forma individualizada en humanos (Ballyns y cols., 2011; Turo y cols., 2013).

Si analizamos las imágenes de microscopía electrónica de los nodos de contracción que se obtienen con neostigmina a dosis terapéuticas (Hudson y cols., 1978; Duxson y Vrbová, 1985), se observa la presencia de un espacio de varias decenas de  $\mu\text{m}$  a ambos lados de las fibras musculares, y dentro de este, la presencia evidente de fibroblastos (ver Figura I1). Si tenemos en cuenta las dimensiones de una fibra muscular, el aumento de diámetro de aquellas que presenten nodos de contracción no puede ser palpable, por muy acumuladas que se encuentren entre ellas. El conjunto de estas observaciones genera la sospecha de que los PGM puedan ser áreas ricas en glicosaminoglicanos (GAGs). Los fibroblastos, estimulados en parte por el decreciente estado del pH descrito en la crisis energética que se define en la síntesis de la hipótesis integrada (Gerwin y cols., 2004), y en parte también por la presencia de las sustancias descritas por Shah y colaboradores (2005 y 2008), empezarían a sintetizar GAGs, que terminarían por acumularse alrededor del sitio activo, y justificarían la presencia de este espacio virtual en las imágenes. Hay que tener en cuenta que estos GAGs son componentes altamente hidrofílicos, y por lo tanto pueden absorber fácilmente estas sustancias nociceptivas y proinflamatorias

presentes alrededor de la fibra. Desde la vertiente clínica, esto podría explicar que cuando se aplica la técnica de compresión isquémica en un PGM se reducen automáticamente los síntomas dolorosos de los pacientes (Hains y cols., 2010). Esta presión exprimiría el contenido de sustancias nociceptivas de los GAGs, disminuyendo su volumen y disminuyendo así el dolor. Por otro lado, también probaría la tendencia a recidivas que presentan las actuaciones conservadoras en el tratamiento del SDM, ya que, al rehidratarse el área de GAGs, se repetiría el proceso. La lesión inducida por la utilización de la técnica de punción seca, y la reacción inflamatoria que se genera, (Domingo y cols., 2013), sería una de las causas de la extrusión del contenido de los GAGs y podría suponer una de las explicaciones de la efectividad clínica de esta forma de tratamiento.

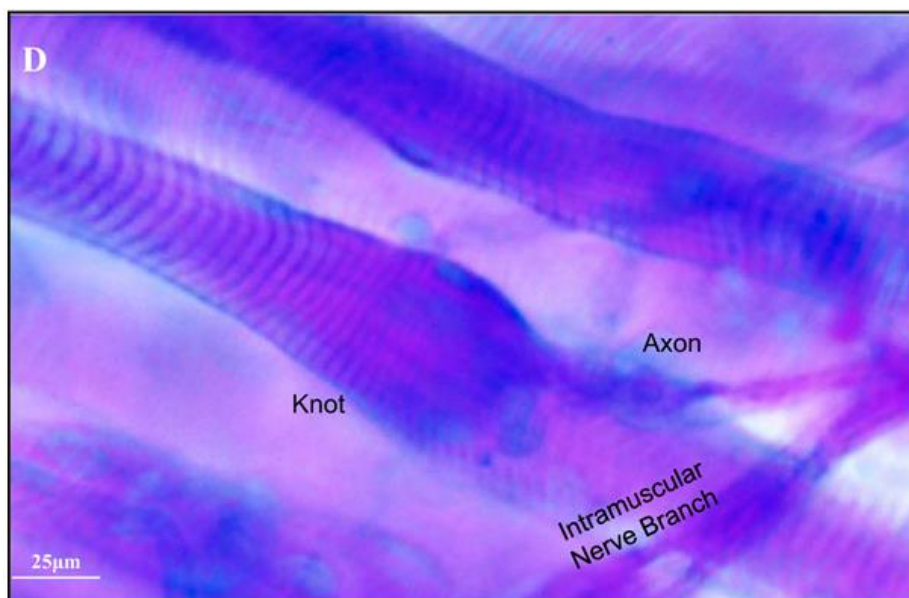


**Figura I. 1. Microfotografía de microscopía electrónica de un nodo de contracción secundario a la aplicación de neostigmina.** La contracción localizada resultó en una extrusión parcial de los componentes de la unión neuromuscular del contorno normal de la fibra. Hay un acortamiento sarcomérico en la zona subsináptica, al mismo tiempo que la presencia de un espacio considerable a ambos lados, que justificaría la presencia de GAGs adyacentes, en parte, por los fibroblastos presentes en la zona. *Fuente:* Imagen de Hudson y colaboradores (1978).

Otra de las cuestiones sometidas a debate es la existencia de una banda tensa dentro de los músculos con PGM. Se ha postulado que los sarcómeros contraídos de los nodos de contracción son los responsables de esto. Como se ha comentado anteriormente, las imágenes clásicamente publicadas de posibles nodos de contracción presentaban una resolución excesivamente baja para poder determinar si existe una zona sarcomérica contracturada (Simons y Stolov, 1976). Recientemente, Gerwin y colaboradores (2020) realizaron un estudio evaluando biopsias musculares



humanas con la finalidad de encontrar alteraciones en el diámetro de sus sarcómeros correspondientes. Aunque con resultados preliminares, encontraron varias series de sarcómeros contraídos segmentariamente. Sin embargo, la interpretación de este hallazgo no descarta la posibilidad que los cambios estructurales en el miocito no estén relacionados con la aparición de PGM, y, por lo tanto, será importante corroborar estos descubrimientos en futuras investigaciones que, por ejemplo, impliquen directamente tejido que presente pruebas electromiográficas de alteración miofascial, siguiendo la misma línea de investigación de los resultados obtenidos en nuestros trabajos previos (Margalef y cols., 2019). Las imágenes obtenidas posteriores a la inyección subcutánea de neostigmina (NTG), a nivel de microscopía óptica presentaban cambios evidentes en el acortamiento de los sarcómeros, asociado a un engrosamiento de la fibra muscular en forma de nodo de contracción (ver Figura I.2).



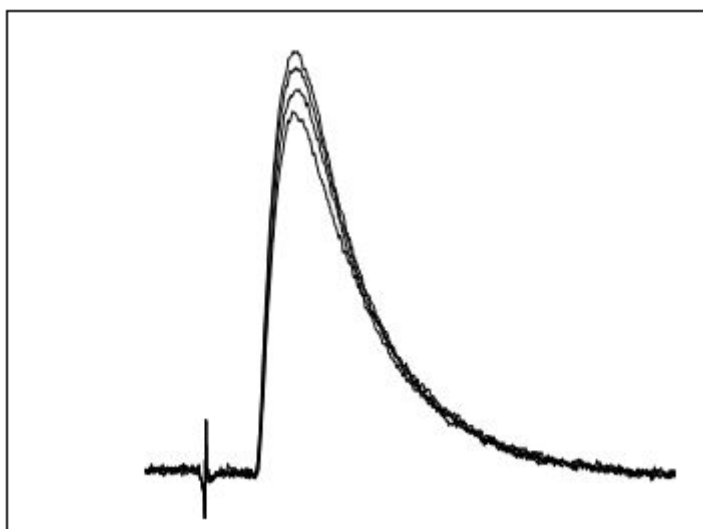
**Figura I. 2.** Microfotografía de un PGM visualizado con PAS-Alcián. Imagen obtenida 30 minutos después de la administración de neostigmina subcutánea. Detalle de un nodo de contracción. Se identifica un engrosamiento de la fibra muscular, los sarcómeros están mucho más prietos y se identifica claramente un axón que lo inerva. La coloración rosada indica la existencia de GAGs neutros y la coloración azulada indica la presencia de GAGs ácidos. Ampliación inicial 400X. Fuente: Imagen de Margalef y colaboradores (2019).

#### **1.4.- ACTIVIDAD NEUROMUSCULAR Y DOLOR MUSCULAR.**

##### **1.4.1.- Conceptos básicos de la actividad neuromuscular.**

La neurotransmisión evocada se origina con la llegada del potencial de acción al axón unido a un miocito mediante su sinapsis correspondiente. En este momento, se

produce la liberación de cientos de vesículas sinápticas. Cada 2 moléculas de ACh activan un receptor (AChR) dispuestos concentradamente bajo el axón. Los AChR son canales iónicos de  $\text{Na}^+$  y, cuando se activan, posibilitan la entrada de este ión dentro del citoplasma celular, elevando el potencial de membrana del miocito a valores de disparo y originar así el potencial de acción en la fibra muscular e incluso una contracción (Sanes y Lichtman, 1999). Este movimiento iónico local de la membrana se conoce como “end plate potential” o EPP, y es el componente principal del primer tipo de neurotransmisión detallada, conocido como “neurotransmisión cuántica evocada”. En la Figura I.3 se muestra un registro ejemplo de EPP. El registro del EPP consiste en una línea de base que presenta un pico parabólico, muy parecido a una ola, que sube abruptamente hasta un máximo y baja más lentamente hasta la línea de base inicial. Todo este proceso es el reflejo del intercambio iónico postsináptico desencadenado por la unión de las moléculas de ACh con sus receptores (Santafé y cols., 2000; Santafé y cols., 2002).



**Figura I. 3. Esquema de un EPP (end plate potential).** Fuente: Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

Pero no todo el tipo de neurotransmisiones son evocadas, están descritos otros dos tipos de neurotransmisión muy importantes para el desarrollo y funcionamiento muscular. Por un lado, la neurotransmisión espontánea que se detalla en el apartado siguiente y, por otro lado, la neurotransmisión subcuántica. Esta última es la más desconocida, y seguramente menos participativa de las tres. Durante su ejecución, no se libera ninguna vesícula sináptica, por lo tanto, no se trata de una neurotransmisión puramente cuántica. Lo que sucede, es que, de forma continuada, se van perdiendo grandes volúmenes de ACh. Al ser continuada, nunca se llegaría a generar ningún

potencial (Santafé y cols., 2000). Se ha hipotetizado que este formato subcuántico de liberación del neurotransmisor en uniones neuromusculares permite un mayor control tónico en la propia neurotransmisión, y de esta forma, la liberación de ACh siempre tiene un porcentaje de autocontrol (Magleby y Miller, 1981; Carlson y Kriebel, 1985).

#### **1.4.2.- Neurotransmisión espontánea.**

El registro de la neurotransmisión espontánea corresponde a la morfología de los EPPs, pero en miniatura. Estos episodios aparecen de forma estocástica, a una frecuencia de 40-60 eventos por minuto. Esta forma de transmisión está descrita como aquella en la que, en condiciones normales, y de manera regular, se liberan vesículas sinápticas sin ningún estímulo eléctrico intermediario ni provocado, y no produce el potencial de acción, ni, por lo tanto, puede haber contracción de la fibra muscular (Santafé y cols., 2000; Santafé y cols., 2002). La generación de los mEPPs incluye los mismos mecanismos que participan en la neurotransmisión evocada (Liley, 1954). Se le atribuye una función relacionada con el trofismo muscular, especialmente en situaciones de inactividad muscular.

#### **1.4.3.- Actividad neuromuscular y su relación con el dolor muscular.**

En 1975 aparecieron los primeros estudios que describen cambios significativos en la actividad eléctrica del músculo doloroso (Cobb y cols., 1975). Anteriormente, Travel y colaboradores (1942), habían generado un modelo teórico en el que se involucraba una relación mutuamente reforzada entre el dolor crónico y la hiperactividad muscular. Según este estudio, la transformación de una condición aguda a crónica se explicaba por una disfunción muscular causante de dolor, y este propio dolor retroalimentaba a la disfunción. Esta pauta, aunque ampliada posteriormente, ha estado durante muchos años aceptada (Blasberg y Chalmers, 1989; Parker, 1990), incluyendo el concepto de que la propia hiperactividad muscular podría deberse a anomalías estructurales (Moss, 1988) sea por fatiga (Jones y cols., 1987), alteraciones en la posición y en el movimiento, o por factores estresantes u otras alteraciones psicológicas asociadas (Green y cols., 1982; Laskin y Block, 1986; Yunus, 1988), entre otros. Aunque muchos estudios respaldan esta hipótesis además que en los primeros registros electromiográficos se obtenía una actividad muscular anormal en músculos dolorosos, hay también discrepancia, sobre todo por lo que se refiere a la actividad durante la función muscular. Hay estudios en los que no

encontraron cambios suficientes como para relacionar la hiperactividad como una causalidad o perpetuación del dolor muscular (Lund, 1991). De todas formas, la limitación en esta relación realmente se encuentra en aquellos estudios en los que se evalúa a pacientes con dolor muscular crónico. La falta de evidencia convincente para apoyar a la hiperactividad como factor etiológico en esta forma de dolor, se ha evidenciado repetidamente (ver, por ejemplo, Chapman, 1986; Ahern y cols., 1988; Graven-Nielsen y cols., 1997). Existen estudios que concluyen que estos cambios neuromusculares que se describen en varias condiciones de dolor crónico son adaptaciones protectoras que pueden justificarse por la acción del propio dolor en las interneuronas segmentarias (Lund, 1991). Sin embargo, esto no implica que el rendimiento motor muscular no se vea afectado durante un proceso doloroso. Al contrario, es probable que la combinación entre un componente psicogénico con una serie de defectos metabólicos específicos, actualmente sin identificar, puedan ser causas de mialgia en este tipo de dolor (Mills y Edwards, 1983).

La relación entre dolor muscular y la actividad electromiográfica en reposo todavía hoy sigue siendo un tema de debate. La electromiografía permite valorar la denominada actividad espontánea del músculo. Mediante el análisis de la neurotransmisión evocada, que es la responsable de la contracción del miocito no se encuentran cambios que justifiquen su relación con el dolor muscular (Intrieri y cols., 1994). En cambio, cuando se considera a la actividad espontánea, se observa mucha controversia relacionada con el SDM. Por un lado, varias observaciones clínicas indican que, en músculos que presentan dolor, se encuentra más tensión y una asociación directa a una mayor actividad electromiográfica en comparación con músculos libres de dolor (Mercuri y cols., 1979; Dahlström y cols., 1985; Rugh y cols., 1987; Kapel y cols., 1989; Hatch y cols., 1992). Por otro lado, hay estudios bien controlados que no muestran diferencias estadísticamente significativas entre la electromiografía en reposo de músculos dolorosos y no dolorosos (Kravitz y cols., 1981; Nouwen y Bush, 1984). Es habitual encontrar aumentos de la actividad de reposo en la musculatura masticatoria en pacientes con trastornos temporomandibulares cuando son comparados con grupo control (Dahlström y cols., 1985; Rugh y cols., 1987). Todos estos modelos musculares son cuestionables dado que sus resultados podrían estar influenciados por un posible aumento en la actividad electromiográfica de algunos de los músculos faciales que se encuentran adyacentes a la zona y que se contraen para generar la expresión característica que acompaña al dolor (LeResche y Dworkin, 1988).

Ashton-Miller y colaboradores (1990) provocaron dolor muscular agudo, mediante la inyección de 5 ml de solución salina hipertónica y registraron un aumento

en la actividad de reposo del músculo esternocleidomastoideo durante los primeros 2 minutos. Posteriormente, la actividad volvía de forma gradual a los valores control. Esto prueba que el dolor muscular agudo causa cambios sutiles, pero sistemáticos, en la producción motora del músculo relajado. En otro estudio (Svensson y cols., 1998), se encontró un aumento transitorio de la actividad electromiográfica en reposo cuando se aplicaba una solución salina hipertónica comparado con la inyección de la misma cantidad de solución salina isotónica (Svensson y cols., 1998). Estos son algunos ejemplos del hecho que se puede encontrar mayor actividad muscular en reposo de músculos con dolor inducido. En cambio, cuando se realiza una evaluación de esta actividad, solamente con una condición de dolor simulada, en la que a los sujetos se les recuerda una situación dolorosa (sin un estímulo real del dolor) este cambio no sucede (Stholer y cols., 1996). Además, hay evidencia de que el dolor muscular experimental no genera cambios electromiográficos en reposo cuando se aplican contracciones máximas voluntarias, ni tampoco se observa un aumento sostenido cuando este dolor muscular es continuo (Graven-Nielsen y cols., 1997). Esto es indicativo de que la hiperactividad, por sí misma, no está presente debido al dolor muscular y, a la inversa, el dolor muscular sí puede inducir un incremento significativo en la actividad muscular. Induciendo dolor muscular con glutamato se producen cambios importantes en la actividad de reposo de músculos faciales y del cuello (Svensson y cols., 2004). De hecho, mediante esta misma vía de dolor por glutamato, Torisu y colaboradores (2007) observaron que la fatiga muscular influye en las vías reflejas inhibitorias, y el dolor muscular agudo consecuente de esto potencia el aumento local de la actividad electromiográfica en reposo del músculo doloroso, influyendo en la presentación clínica de los síntomas y en la función estructural. Para confirmar esta relación entre dolor y actividad, hay que diferenciar entre las distintas modalidades posibles de dolor, o incluso de músculos involucrados, ya que la respuesta puede ser distinta en cada caso. Según la clasificación desarrollada por Simons y Mense (1998), las fuentes medibles para determinar la tensión muscular incluyen el tono viscoelástico, la contractura fisiológica, la contractura voluntaria y el espasmo muscular. Mientras que las dos primeras no involucran a potenciales de acción de la propia unidad motora para su ejecución y, por lo tanto, dependen de una neurotransmisión evocada, los dos últimos sí que lo precisan. Por otro lado, algunos autores defienden que el origen de esta actividad electromiográfica se encuentra en la placa motora extrafusar del músculo, y que puede desempeñar un papel relevante en la inducción del dolor (Ge y cols., 2011).

De todas formas, actualmente la evidencia existente en humanos del aumento de la actividad electromiográfica durante la presencia de dolor muscular es baja, hecho

que contrasta con los aumentos significativos en la actividad electromiográfica que sí se ha observado en estudios realizados con animales de experimentación (Sessle, 2000; Margalef y cols., 2019).

### **1.5.- ESTRÉS PSICOLÓGICO Y SU RELACIÓN CON EL SDM COMO FUENTE DE DOLOR MUSCULAR.**

Tradicionalmente, el dolor se ha evaluado desde una perspectiva biomédica. Sin embargo, los últimos avances clínicos revelan varias debilidades en este modelo. Los informes de dolor difieren significativamente entre pacientes con grados similares de daño, y la respuesta al mismo tratamiento también puede ser totalmente diferente (Brodal, 2017). Esto se produce, entre otras cosas, por el hecho de que no se aborda adecuadamente el papel de los factores psicológicos en la experiencia dolorosa (Jensen y cols., 1991).

Según varios estudios, sabemos que el SDM presenta una alta prevalencia en pacientes que acuden a la consulta médica por dolor. Un 95% de los pacientes padecen trastornos ocasionados por dolor crónico (Malanga y Cruz Colon, 2010). Estos datos ya fueron en parte comentados en la década de los 80 (Skootsky y cols., 1989), cuando observaron que aproximadamente el 30% de los pacientes atendidos en medicina interna y que presentaban un cuadro diagnosticado de dolor, también mostraban PGM asociados. En otro estudio realizado en un grupo de jóvenes asintomáticos se advirtió que aproximadamente la mitad de ellos presentaban PGM en la cintura escapular (Sola y cols., 1955). Datos como este último demuestran la gran prevalencia existente de PGM latentes. Estos, con la aparición de cualquier factor añadido, entre los cuales podemos encontrar el estrés, pueden terminar activándose, y como consecuencia, convertirse en una fuente de dolor. Otro ejemplo claro, en este caso en animales, es el estudio realizado por Alvarez y colaboradores (2013), en el que analizaron la capacidad del estrés en ratas a la hora de exacerbar el dolor muscular. Para conseguirlo, sometieron a un protocolo de estrés acústico a ratas adultas que previamente habían sufrido una restricción del material de nidificación a lo largo de una semana durante su período neonatal. Posteriormente se evaluó la concentración plasmática de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y factor de necrosis tumoral concretamente), observando un incremento. Este aumento de sustancias sensibilizantes relacionadas con el dolor muscular, pueden resultar un buen punto de partida para justificar el dolor local a la presión y el dolor referido de los propios PGM,

evidenciando aún más la contribución autónoma en el SDM, como se verá más adelante.

La relación entre el dolor derivado de los PGM i el estrés es compleja e inespecífica, ya que no solamente el estrés, tanto psicológico como físico, puede conducir al desarrollo, mantenimiento, agravamiento y/o cronificación del dolor miofascial, sino que el propio dolor generado, puede actuar como factor estresante de forma efectiva para terminar produciendo estos mismos resultados y cerrar el círculo del SDM (Vlaeyen y Linton, 2000). Actualmente no hay en la bibliografía una imagen que pueda expresar la existencia de un nodo de contracción causado por el propio estrés. Aunque el dolor característico de los PGM está clínicamente descrito, no se sabe prácticamente nada de sus manifestaciones y modulaciones cerebrales. De todas formas, sí que aparecen estudios que nos indican la contribución del estrés en el desarrollo de síntomas y signos periféricos y centrales característicos del SDM, y que pueden favorecer la formación y/o perpetuación de los PGM. Se sabe, también, de la gran participación del cerebro en la generación de respuestas hiperalgésicas y la modulación terapéutica del dolor. Contiene potentes mecanismos moduladores que en cuanto el dolor tiende a cronificarse, sufren cambios estructurales y funcionales inadaptados que terminan por alterar su equilibrio. El cerebro también tiene un papel muy destacado en el control de las respuestas al estrés y, aunque el estrés agudo promueve la adaptación de estas respuestas y sirve como mecanismo de protección, el estrés crónico, al igual que sucede con el dolor, puede terminar causando daños centrales relevantes (McEwen, 2007). Niddam y colaboradores (2008) fueron de los primeros en investigar los efectos centrales de la hiperalgesia generado por PGM en pacientes con SDM. La hiperalgesia se asoció directamente con una mejora de la actividad de regiones implicadas en el procesamiento sensorial, discriminativo y afectivo. Pero también observaron una disminución claramente significativa de la actividad del hipocampo dorsal derecho. Aunque se desconoce el significado exacto de esta disminución anormal de la actividad del hipocampo, se sabe que esta estructura cerebral está implicada directamente con procesos de alodinia mecánica (Petrovic y cols., 1999), exacerbaciones de dolor generados por situaciones de ansiedad (Ploghaus y cols., 2001), trastornos de estrés post-traumático (Geuze y cols., 2007) y trastornos somatoformes y psicósomáticos (Stoeter y cols., 2007), lo que le atribuye una afectación directa por parte de factores estresantes. Es muy probable, pues, que esta hipoactividad en pacientes con PGM pueda reflejar una pérdida de regulación del sistema del estrés, generando una influencia espinal y periférica que ayudara a justificar las alteraciones que se producen a nivel neuromuscular, sugiriendo que estas respuestas de estrés disfuncionales pueden tener también un papel

relevante en la generación y/o mantenimiento de la hiperalgesia característica de los PGM.

La evidencia apunta a alteraciones por exceso de activación de los sistemas hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA), y simpaticoadrenal-medular (SAM) en pacientes con PGM (Yoshihara y cols., 2005). Yoshihara y colaboradores (2005) midieron variaciones temporales en las concentraciones de cortisol plasmático, adrenalina y noradrenalina en respuesta a estrés psicológico y encontraron que los pacientes con dolor presentaban unos parámetros significativamente más elevados, que su recuperación a los valores iniciales también era claramente más lenta que en los controles sanos. Otros estudios experimentales ya habían demostrado previamente el efecto de distintos tipos de estrés sobre el eje HHA en distintas circunstancias y con estresores de varios tipos (Douglas y cols., 2005). Aunque a menudo se hace una distinción entre estrés social (o psicológico) y estrés físico, ambos activan los sistemas HHA y SAM solo que, a través de rutas distintas, pero con el mismo efecto final (Treaster y cols., 2006).

Por otra parte, se empieza a intuir la contribución del estrés en la patología periférica del SDM por otro tipo de vías. Estudios realizados tanto en humanos como en animales permiten relacionar el SNA y el estrés, debido a cambios significativos en la actividad autonómica plasmada en modificaciones de la actividad eléctrica espontánea (AEE) del propio músculo mediante electromiografía (Shah y cols., 2008). Hubbard y Berkoff (1993) aplicando la fentolamina, un bloqueante simpático, administrado por vía intravenosa, observaron que eliminaba la actividad espontánea en la zona del PGM sin afectar la actividad muscular voluntaria. En otros animales aplicaron curare, una toxina que bloquea los receptores de la ACh, y así, consiguieron la abolición de la actividad voluntaria, pero en este caso no se generaba una disminución de la actividad espontánea del PGM. Estos resultados sugirieron una primera relación con el sistema nervioso simpático (SNS) y los PGM. Hubbard y Berkoff lo relacionaron directamente con el huso muscular, ya que sus fibras intrafusales, a diferencia de las extrafusales, se encuentran inervadas de forma simpática y no bajo el control de la neurona motora  $\alpha$ . Posteriormente, Chen y colaboradores (1998) usaron de nuevo la fentolamina sobre un PGM de roedor previamente localizado mediante su ruido de placa, y observaron que la inyección de este fármaco generó automáticamente una inhibición de la AEE. Otros estudios en humanos demostraron un aumento del ruido de placa en el momento en el que se generó una situación estresante (como, por ejemplo, un cálculo aritmético mental) (McNulty y cols., 1994; Lundberg y cols., 2010). Estos estudios sugieren una participación de la actividad simpática en estos puntos gatillo (ver, además Bengtsson



y Bengtsson, 1988; Martínez-Lavin, 2004). El conjunto de estos resultados, sugieren, potentemente, una influencia autonómica, como por ejemplo el propio estrés, sobre la liberación de ACh, y, por lo tanto, la capacidad de modular la actividad motora de los PGM que puede contribuir en la generación o perpetuación del SDM.

Además, existen otras evidencias de la contribución simpática con el dolor local y referido, y con los fenómenos autonómicos que se manifiestan en las características del SDM descritas (Simons y cols., 2002a). Otros autores corroboraron la hipótesis de que los cambios electromiográficos registrados en los PGM podían estar relacionados con la actividad de un huso muscular estimulado por un nervio simpático excitado, asociándolo a una interacción simpática-sensorial (Ge y cols., 2006). Esta hipótesis, pues, implicaría que los síntomas propios del SDM estarían unidos a la irritación del SNA, tal como se describe en la hipótesis integrada (Gerwin y cols., 2004).

En esta misma línea, se ha observado que el SNS también coopera directamente con la constricción capilar, así como la activación de receptores de nociceptores, e indirectamente, a través de la desregulación del equilibrio que impera en la producción de citocinas proinflamatorias (Maekawa y cols., 2002; Roberts y Elardo, 1985).

#### **1.6.- ESTRÉS PSICOLÓGICO COMO FACTOR DE GENERACIÓN Y PERPETUACIÓN DE PGM.**

Los factores de perpetuación tienen un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento del SDM. Se han propuesto diversos factores que pueden resultar responsables de la activación de un PGM, algunos de ellos son directos, como sobrecargas de la función muscular, enfriamiento o el sobreestiramiento, mientras que otros son más bien indirectos, como las radiculopatías, patologías viscerales o articulares (Sola y cols., 1995). Dentro de este segundo grupo está incluido el estrés, considerando que tiene una influencia importante en este tipo de disfunción neuromuscular, en gran parte debido al ritmo de vida de la sociedad actual. El manejo adecuado de los factores etiológicos y permutadores del SDM se considera decisivo a la hora de garantizar un abordaje terapéutico exitoso y duradero de este síndrome (Jaeger, 2013; Shah y cols., 2015).

Recordar, que la hipótesis integrada postula que el factor desencademante es la neurotransmisión anormalmente alta, y para ello una de las posibilidades que se proponen es la involucración del estrés psicológico. En este sentido, Kristiansen y colaboradores (2017) registraron una disminución del umbral de dolor a la presión tras

un día de privación de sueño que se recuperaba tras una sola noche durmiendo con normalidad. Por lo tanto, se podría hipotetizar que un factor psicológico como la falta de sueño temporal podría favorecer en este caso el desarrollo y mantenimiento de dolor craneofacial de origen miofascial, y aunque para confirmar ese dato es necesaria la valoración de otros parámetros relacionados con el dolor miofascial, sigue la línea comentada hasta el momento.

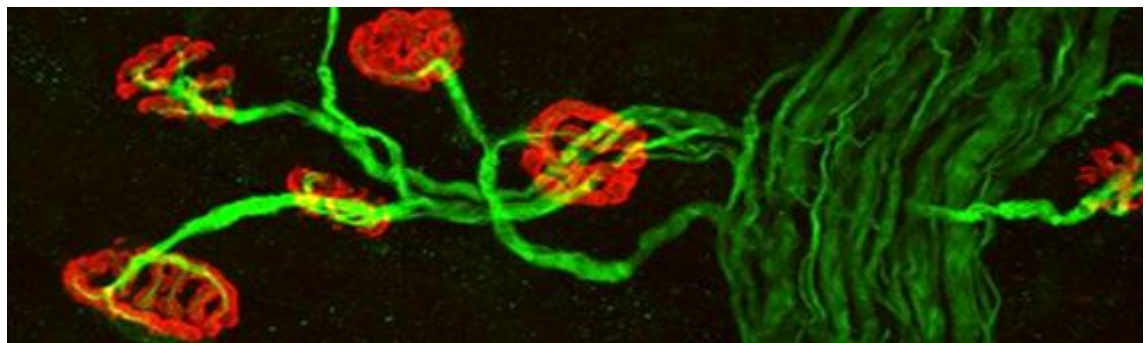
Se especula que todo aquello que aumente la neurotransmisión puede ser indicativo de presentar un papel relevante en la patogénesis y/o mantenimiento de los PGM.

Otro mecanismo que aumenta la neurotransmisión es el aumento de la contracción muscular (Jafri, 2014). La contracción muscular requiere de potenciales evocados que provocan un incremento de ACh en la hendidura sináptica que, de la misma forma que se establece en el desglose de la hipótesis integrada, corresponde al inicio de la secuencia fisiopatológica de los PGM (Gerwin y cols., 2004). A parte, también se ha propuesto al contraste térmico, ya que está demostrado que la exposición a cambios de temperatura, y especialmente al frío, genera una serie de consecuencias metabólicas que pueden terminar produciendo alteraciones en la neurotransmisión, tanto evocada como espontánea (Mana y Grace, 1997; Macedo y cols., 2014). Finalmente, también se ha propuesto el sobrepeso como factor generador y/o perpetuador de PGM. En la hipótesis integrada, se destaca que la presencia de sustancias sensibilizantes en el entorno de los PGM, pueden, por un lado, activar nociceptores específicos de nervios periféricos, estimulando así las neuronas nociceptivas de la asta dorsal y terminar provocando dolor, y, por otro lado, contribuir en la perpetuación de la disfunción de la placa motora mediante un aumento de la actividad neuromuscular espontánea (Gerwin y cols., 2004). Algunas de estas sustancias sensibilizantes, descritas en su momento por Shah en el entorno de los PGM activos (Shah y Gilliams, 2008), resultan ser las mismas que las encontradas en el músculo esquelético de las personas obesas (Wu y Ballantyne, 2017). Recientemente en nuestro laboratorio (Gimenez-Donoso y cols., 2020) se ha aplicado una “dieta cafetería” y una “dieta alta en grasas” añadidas a la dieta habitual de roedores durante 4-6 semanas. Este período fue suficiente para conseguir un incremento en su peso y un incremento de la neurotransmisión espontánea. Esta permaneció elevada hasta las 3 semanas siguientes de la retirada de la dieta, en ambos casos.

Se ha comentado en el apartado anterior que algunos estudios en animales y humanos han observado el efecto de los cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo y su relación directa con cambios en el aumento de la actividad eléctrica espontánea, sugerentes de su involucración en la formación y mantenimiento de PGM

(Shah y Gilliams, 2008; Chen y cols., 1998; Lundberg y cols., 2002; McNulty y cols., 1994). Todo esto supone un paso importante para tener en cuenta en el estudio del estrés como factor desencadenante/perpetuador del SDM.

## 2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.





## **2.1.- HIPÓTESIS.**

### **2.1.1.- Hipótesis general.**

El estrés genera un aumento en la neurotransmisión espontánea que provoca imágenes de nodos de contracción y, por lo tanto, supone un factor en la generación y/o mantenimiento de los PGM.

### **2.1.2.- Hipótesis específicas.**

- 1.- El estrés agudo, evaluado de forma aislada, es suficiente para mostrar cambios neuromusculares y morfológicos para ser considerado como un factor potencialmente relevante en el desarrollo del SDM.
- 2.- El estrés crónico, generado a partir de la sumación de los factores estresantes agudos, genera un incremento de la neurotransmisión espontánea y nodos de contracción que se perpetúan durante varias semanas reforzando su papel transcendental en la creación y/o perpetuación de los PGM.

## **2.2.- OBJETIVOS.**

### **2.2.1.- Objetivo general.**

El objetivo general de esta tesis fue evaluar la relación entre el estrés y la generación de puntos gatillo miofasciales, valorando su implicación en la modulación del aumento de la neurotransmisión espontánea, y evaluar su duración.

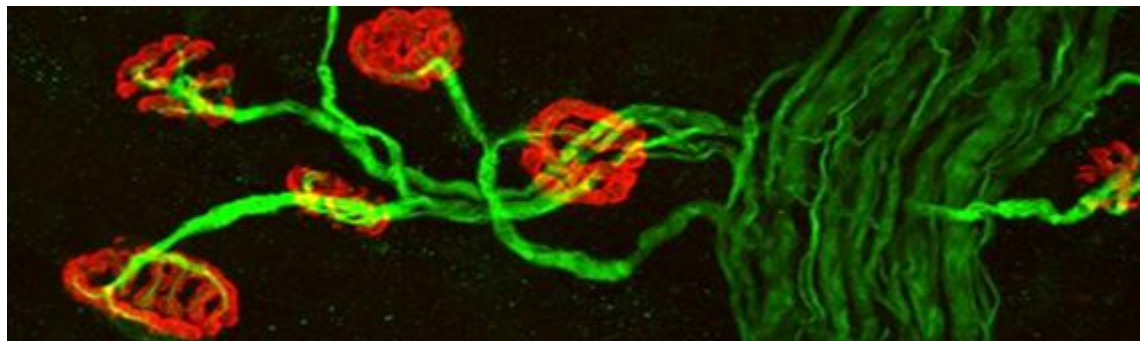
### **2.2.2.- Objetivos específicos.**

- 1.- Valorar la influencia del estrés en la neurotransmisión espontánea en cada uno de los tipos de estrés analizados. Estudiar la posible relación funcional entre la aplicación de la inmovilización, el FST a 21°C, la privación de alimento y agua, el aislamiento social mediante jaula metabólica y ultrasonidos, respectivamente y de forma aislada, y la modulación de la actividad neuromuscular en la liberación de

acetilcolina en la neurotransmisión espontánea mediante registro intracelular y electromiografía.

- 2.- Determinar la capacidad del estrés en la creación de nodos de contracción en cada uno de los factores estresantes estudiados. Estudiar la posible relación morfológica y estructural entre la aplicación de la inmovilización, el FST a 21°C, la privación de alimento y agua, el aislamiento social mediante jaula metabólica y ultrasonidos, respectivamente y de forma aislada, y la generación de imágenes característicamente compatibles con el PGM.
- 3.- Analizar la capacidad del estrés crónico generado por la exposición a estresores secuenciales combinados de elevar la neurotransmisión espontánea y evaluar su duración mediante registro intracelular y electromiografía.
- 4.- Determinar la capacidad del estrés crónico generado por la exposición a estresores secuenciales combinados en la creación de nodos de contracción.

### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS.







### 3.1.- ANIMALES.

Los animales de experimentación usados para este trabajo fueron ratones macho albinos *Swiss* adultos con una edad media comprendida entre 30 y 45 días.

El suministro y facilitación de los ratones *Swiss* fue el laboratorio comercial *Charles River*. El principal motivo por el que se escogió este modelo de animal es su mantenimiento sencillo y económico que se adecuaba perfectamente a las condiciones económicas del departamento. Además, al ser pequeños permite una fácil manipulación y al tener una corta expectativa de vida permite realizar distintos tiempos de trabajo considerados como crónicos.

Respecto a su mantenimiento, los animales se encontraban bien dispuestos en las instalaciones del estabulario de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili, acomodados en jaulas de 5 animales por camada, para una mayor homogeneidad en los experimentos.

La estabulación de los animales se ha llevado a cabo en jaulas de plástico de medidas estándar de la marca MAKROLON<sup>R</sup>, con unas medidas de 27x27x14 cm<sup>3</sup>. La sala donde se almacenaban las jaulas mantenía una temperatura regulada mediante termóstato electrónico de 20-22°C y una humedad relativa de 60-70%. Ciclo de luz controlado por temporizador de 12 horas de día (mediante luz de neón blanca), y 12 horas de oscuridad, para evitar oscilaciones de las variables biológicas de los animales que pudiesen alterar su conducta en cuanto al desarrollo del estrés. Por otro lado, la alimentación e hidratación *ad libitum* de los animales a base de agua clorada y pienso para ratón VRF-1 (*Charles River*). La limpieza de las jaulas se realiza una vez por semana mediante el cambio tanto de la jaula como de las virutas. Finalmente, también se realizó una revisión semanal, para detectar y descartar aquellos animales lesionados o con comportamientos anormales que pudieran alterar la homogeneidad de los experimentos.

Cuando fue necesario, los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal mediante tribromoethanol 2% (TBE). La cantidad suministrada correspondía a 0,15 ml de TBE por cada 10 g de peso del animal, aumentando esta cantidad en función de la pérdida de reflejos, básicamente plantar y/o ocular, indicativo absoluto de que el animal estaba completamente anestesiado. Una vez asegurada esta condición, se procedía al sacrificio mediante la técnica de exsanguinación por sección de la vena yugular izquierda (esta práctica es necesaria para eliminar la sangre de la zona a diseccionar, para evitar complicaciones durante la extracción, o durante la eliminación de esfacelos o tejido conectivo sobrante). Tanto el método de extracción como los

músculos utilizados para los experimentos están ampliamente descritos en el apartado “Obtención de las muestras”.

Los procedimientos realizados con los animales se ajustaron siempre a los principios éticos de la experimentación descritos por la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea de noviembre de 1986 (86/609/EEC) para la manipulación de animales de laboratorio y contemplando las directrices establecidas en la ley 5/1995, del 21 de junio, de protección de los animales usados para la experimentación y por otras finalidades científicas, aprobada por el Parlamento de Catalunya (Directiva 86/609/EEC).

### **3.2.- MODELO EXPERIMENTAL.**

Los músculos utilizados en este trabajo fueron: el músculo “*Levator auris longus*” (LAL), estudiado *ex vivo* para la identificación y localización de posibles nodos de contracción asociados en el músculo mediante la técnica de tinción PAS-alcián, y también para el registro de posibles cambios en la neurotransmisión espontánea, evaluados mediante el uso de la técnica de electrofisiología de registro intracelular; y los músculos gastrocnemios (ver mas adelante), estudiados *in toto* para determinar posibles modificaciones en el ruido de placa mediante electromiografía.

#### **3.2.1.- Justificación del uso del músculo LAL.**

El músculo esquelético LAL utilizado en esa tesis es un músculo plano exclusivamente compuesto por fibras fásicas (Erzen y cols., 2000). Consta de dos partes que están estructuradas por muy pocas capas celulares, lo que, juntamente con su fácil accesibilidad (ya que se trata de un músculo subcutáneo), y su plana morfología, permiten una fácil extracción y mejoran la precisión durante el transcurso de los registros intracelulares. Estas características también facilitan las tinciones, diferenciando claramente todos sus componentes sin tener problemas con la densidad celular. Esto permite tener una visión completa de todas las terminaciones nerviosas correspondientes a la rama posterior del nervio facial (que es su nervio nutricio), pudiendo así localizar las placas motoras sin tener que realizar secciones ni alterar la estructura muscular (Tomás y cols., 2000), lo que determina su capacidad como modelo perfecto para poder realizar estudios funcionales y morfológicos. Por estos

motivos también se ha usado previamente en nuestro laboratorio (Domingo y cols., 2013; Margalef y cols., 2019).

### **3.2.2.- Justificación del uso del complejo muscular tríceps sural.**

En el caso del registro electromiográfico, sabemos que su uso en pacientes que presentan patrones característicos de SDM, permite localizar fácilmente ruido de placa, y que incluso autores como Gerwin y colaboradores (1997) lo califican de patognomónico de este síndrome. En los registros electromiográficos de la neurotransmisión espontánea hay muchas más posibilidades de lesión que durante el transcurso de un registro intracelular. El LAL no cumple estos requisitos, ya que se trata de un músculo demasiado fino.

Inicialmente este músculo parecía ideal por su disposición estructural de las fibras, su específico patrón de distribución de sus uniones neuromusculares (Wigston, 1990, Alford y cols., 1987) y por su fácil acceso, ya que se trata, igual que el LAL, de un músculo muy superficial, en el que para introducir la aguja de registro simplemente era necesario realizar un pequeño corte de la piel y tejido subcutáneo, mínimamente invasivo y lesivo. Al mismo tiempo, también era muy favorable su predominancia de fibras IIA, coherente con el hecho de que el gastrocnemio se considera un músculo de contracción principalmente rápida (Sher y Cardasis, 1976), y, por lo tanto, con una funcionalidad y comportamiento parecido al LAL.

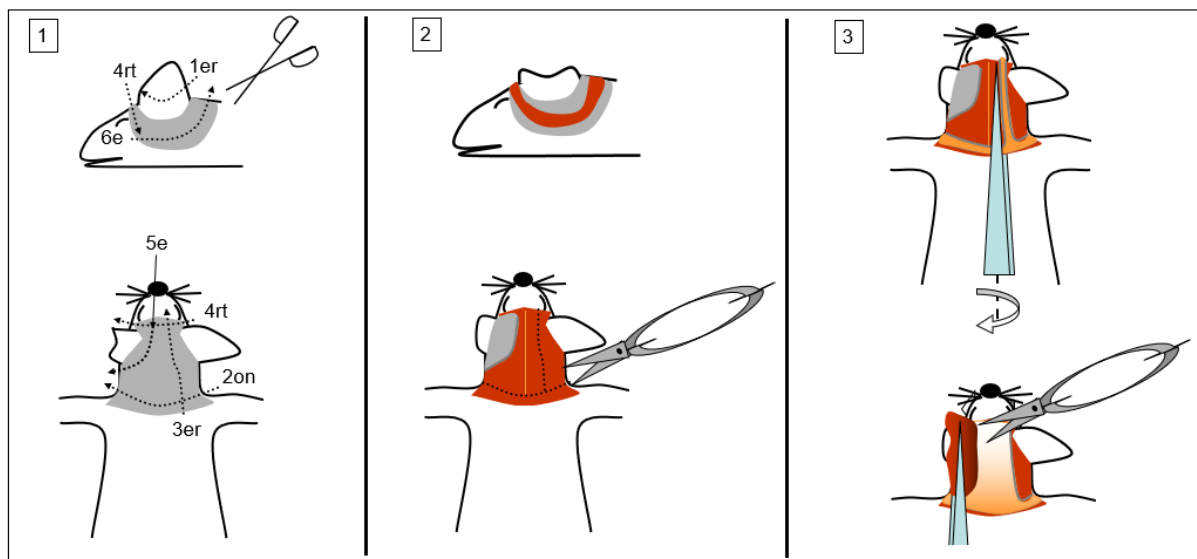
Probablemente, no se registra solamente el músculo gastrocnemio en un animal de dimensiones tan reducidas como un ratón. Debido a la manera como se encuentran dispuestos los músculos posteriores, y la poca separación que hay entre ellos, facilita mucho que durante el experimento se pueda añadir información de la actividad eléctrica de otros músculos. Por este motivo, llegamos a la conclusión de que el paquete posterior muscular conocido como tríceps sural, era el modelo ideal para el transcurso de nuestros experimentos electromiográficos.

### **3.3.- DISECCIÓN DEL MÚSCULO LAL.**

El músculo LAL está compuesto por una parte cranial, dispuesta desde las espinas de la 4<sup>ta</sup> vértebra cervical hasta la parte anterior de la base del pabellón auricular, y una parte caudal, que se extiende desde la 4<sup>ta</sup> y 5<sup>a</sup> vértebra cervical hasta la parte posterior de la base del mismo pabellón auricular; esta peculiar disposición

permite al ratón el movimiento rápido y efectivo de su pabellón auricular (Agnaut-Petit y cols., 1987; Erzen y cols., 2000).

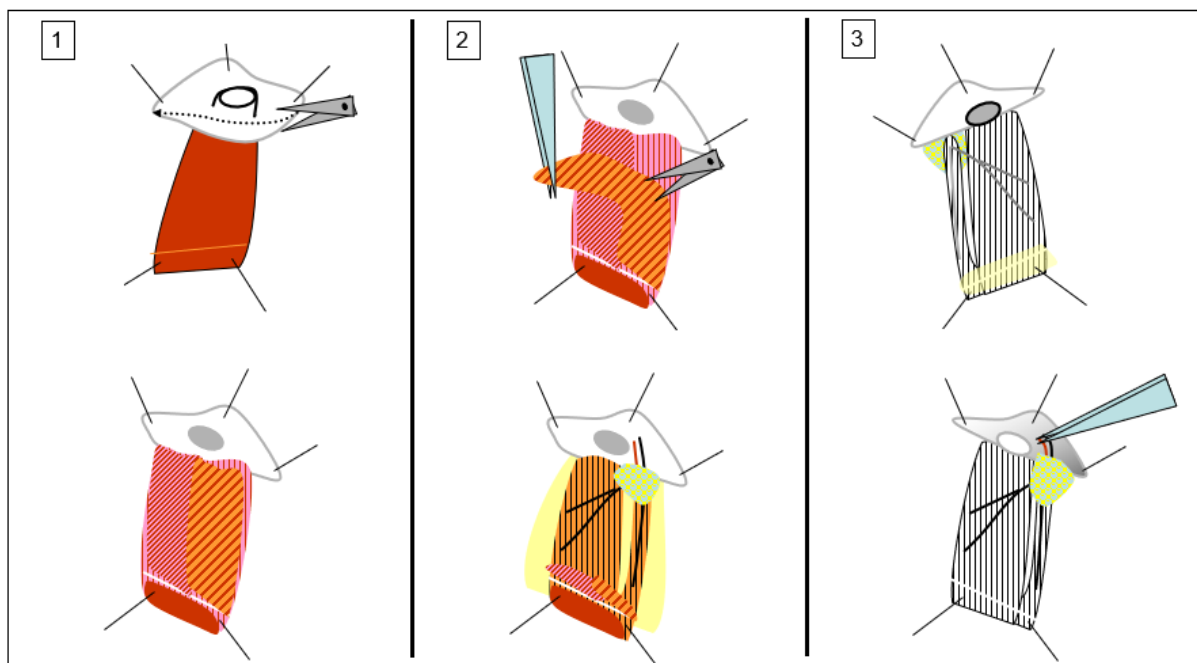
Para su disección, el primer paso consistió en anestesiarse el ratón, depilar la zona anatómica correspondiente a la intervención (en este caso, la zona dorsal de la cabeza del roedor), y proceder al sacrificio por exsanguinación (para más detalles, ver el “apartado 3.1. Animales”). Posteriormente, se colocó el animal en decúbito prono en una plataforma de corcho. Se eliminaron las orejas, asegurando dejar la porción más distal de inserción, ya que el músculo tiene sus inserciones allí. A continuación, se hizo un corte, justo por encima del omóplato, y en dirección a la cabeza en forma de T, y se extrajo la piel, bordeando la zona de las orejas (especial atención con la trayectoria aplicada con las tijeras, para proteger las inserciones del músculo). De esta forma, se consigue dejar a la vista al paquete muscular que se encuentra bajo la piel (ver Figura M.1). El siguiente paso, más delicado, consiste en desinsertar completamente el músculo, incidiendo especial atención a sus dos inserciones principales, en la oreja y en la línea media que une a los dos músculos LALs (aunque hay dos, el aprovechamiento sólo es del lado izquierdo, por el hecho de la forma como están establecidos los aparatos de electrofisiología, que facilitan su disposición durante el registro experimental).



**Figura M. 1. Extracción del músculo LAL del ratón.** Se puede observar en 1 (gris), las zonas que se depilan para poder acceder al músculo con más facilidad. Las líneas de puntos son las trayectorias ordenadas de las incisiones para separar el músculo del animal. En rojo, la disposición muscular de la zona de la cabeza del roedor; en línea amarilla, representación gráfica de la línea media que separa los dos LALs. *Fuente:* Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

Una vez extraído el paquete muscular del animal, se dispuso en una placa de Petri recubierta de Sylgard® y sumergido en una solución fisiológica oxigenada de

composición y osmolaridad similar al serum, conocida como "Ringer" (ver composición en "Tabla M.1."). Se estiró y se fijó con la ayuda de agujas entomológicas, de tal forma que la cara externa del LAL quede hacia arriba (posición anatómica). En esta posición, y con una lupa binocular estereoscópica, se hizo una primera limpieza de tejido conectivo adyacente a la zona, y se cortó el exceso de piel de la oreja restante, que puede dificultarnos la visión de las inserciones. A continuación, se dio la vuelta al músculo, de manera que en esta ocasión quedase hacia arriba la cara interna del LAL (que es la posición de colocación final en la cámara de registro), y se fueron eliminando las capas superficiales de la musculatura contigua, capa a capa, procurando no lesionar las fibras musculares durante el procedimiento. Es muy importante ir renovando con frecuencia (mínimo cada 10-15 minutos) el Ringer. Otro de los problemas habituales fue la cantidad de grasa que se encuentra asociada a esta zona; para ir quitándola, habrá que girar completamente el músculo, varias veces (ver Figura M.2). Concretamente para los experimentos electrofisiológicos, hay que tener mucho cuidado en no lesionar el tejido y mantener intacto su patrón de inervación, ya que, al trabajar con una muestra viva, cualquier alteración de la estructura significará también una alteración directa en su función, y específicamente, en la neurotransmisión que se produce. Por este motivo, también tendrá gran relevancia eliminar el máximo de tejido conectivo que rodea las fibras musculares, aponeurosis y esfacelos presentes durante el transcurso de la disección. Finalmente, se dipositó, bien estirado, en una cámara de registro de 1,5 ml, manteniéndolo sumergido en solución de Ringer renovada y oxigenada.



**Figura M. 2. Disección del músculo LAL.** 1, en rojo, la disposición muscular de la zona de la cabeza del roedor. 2, en amarillo, tejido conectivo adyacente; en verde, tejido adiposo y grasa subcutánea. La última imagen (3, abajo) pertenece a un esquema de la inervación y su disposición y distribución anatómica en el LAL, fundamental para determinar los puntos de mayor actividad neuromuscular presente. *Fuente:* Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

### 3.4.- PROCEDIMIENTOS PARA PROVOCAR ESTRÉS.

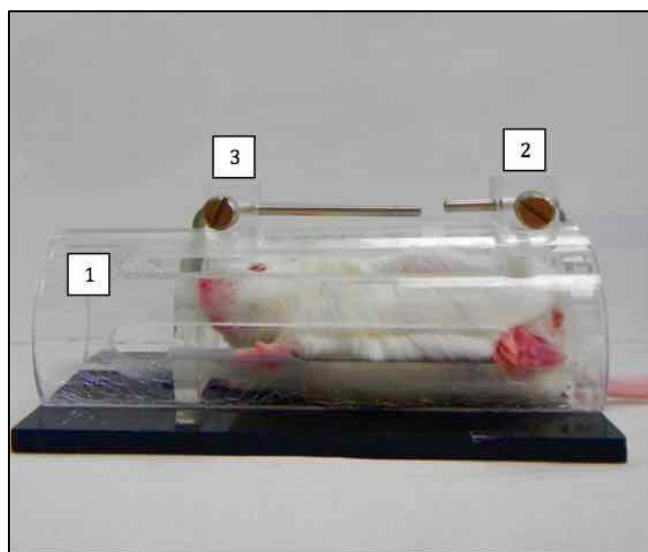
#### 3.4.1.- Inmovilización.

Consiste en inmovilizar al ratón durante una hora al día, a una temperatura ambiente de 24-26°C.

Para realizarlo, se utilizó una jaula estándar validada y especialmente diseñada para tal efecto, con unas medidas de 10x3x3,5 cm<sup>3</sup> (ver Figura M.3). La jaula consta de dos puertas deslizantes asimétricas, una trasera, de recorrido más corto, con un agujero inferior adaptado para la colocación e inmovilización de la cola del ratón, y una delantera, de recorrido más largo. Ambas puertas se encuentran sujetas por la parte superior de la base cilíndrica de la propia jaula. Los laterales de la jaula presentan una serie de agujeros, necesarios tanto para la ventilación adecuada del animal, como también para permitir su control y vigilancia. Para conseguir la restricción de movilidad del animal, previamente se desarma la puerta delantera, para generar más espacio en la jaula, y se quita la puerta trasera para introducir el ratón mediante una sujeción de la cola; seguidamente, se coloca nuevamente la puerta trasera, controlando que la cola

del animal pueda salir sin problemas por el agujero inferior de la puerta adaptado para ello, y se desliza de nuevo la puerta delantera, reduciendo el espacio libre de la jaula a la justa medida del animal.

Finalmente, se adhiere la cola para evitar que el animal pueda voltearse con su ayuda, y se inicia el seguimiento del tiempo de 1 hora de duración. Este procedimiento también se realizó con repetición a lo largo de 5 días seguidos. El tiempo post-tratamiento se evaluó 1 hora, 3 horas y 5 días después del tratamiento de estrés o, al quinto día, después de un estrés por reducción de movilidad de 1 hora durante 5 días consecutivos.



**Figura M. 3. Jaula estándar para inmovilización del ratón.** 1) Base cilíndrica de la jaula estándar (10cm largo, 3cm alto y 3.5 cm diámetro) 2) Puerta trasera por donde se introduce al ratón y se sujeta la cola. 3) Puerta delantera que se desliza para reducir el espacio. *Fuente:* Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

### 3.4.2.- Prueba de natación forzada o de Porsolt (FST, *forced swim test*).

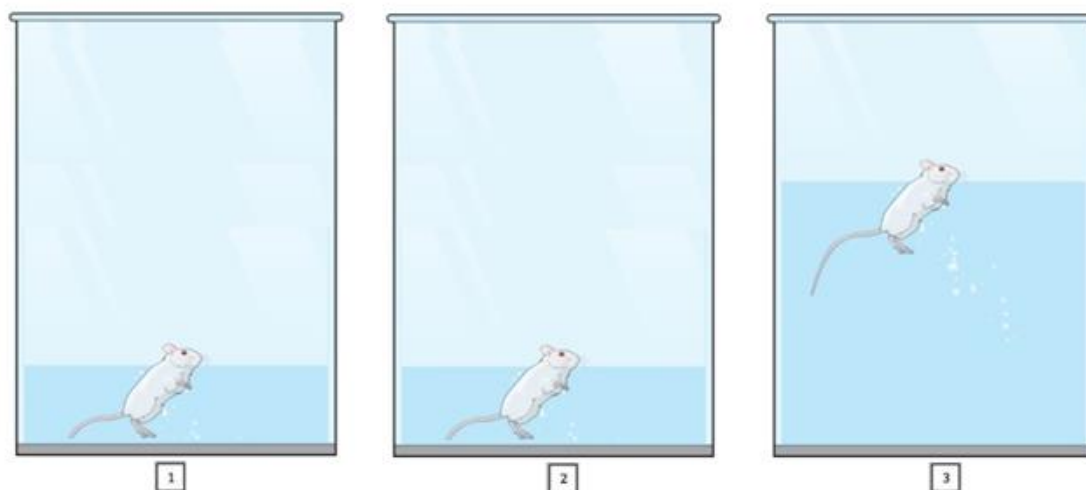
Este método consistió en la introducción del animal en un cubo cilíndrico de plexiglás (40 cm de alto y 20 cm de diámetro) lleno de agua (altura 20-25 cm) de paredes lisas durante 6 minutos y con una temperatura de  $21^{\circ}\text{C} \pm 2$  (Molendijk y de Kloet, 2019).

En el presente estudio se modificó el protocolo clásico (Molendijk y de Kloet, 2019) para discernir el estrés generado mediante la prueba de natación forzada del que posiblemente también se ocasionara por la baja temperatura del agua. En un primer momento (ver apartado 4.2. de resultados), se realizó la prueba con el agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , para eliminar este factor estresante, pero no se obtuvieron los resultados adecuados. Así que se procedió a variar tanto los tiempos del primer día, como



aquellos parámetros que permitieran agregar un día más a la habituación por parte del animal.

Para habitar el roedor a la temperatura de 21°C y evitar así que el frío no influyera en el experimento como estresor adicional, el primer día se introdujo el ratón en el cubo, sin llenarlo de agua por completo, simplemente la suficiente como para que el animal pudiera mantener el contacto con el suelo del recipiente (altura de 2-3 cm), a una temperatura de 37°C durante un total de 6 minutos. A las 24 horas, se le introdujo nuevamente en el recipiente, con la misma cantidad de agua que durante el día anterior, pero con la diferencia de que esta vez la temperatura era de 21°C durante otros 6 minutos más. El tiempo se evaluó inmediatamente y 24 horas post-tratamiento. Justo al terminar este procedimiento se realizó la electromiografía de la pata izquierda del animal, en la parte experimental correspondiente. Así se obtuvieron valores del nivel de estrés generado solamente por la aplicación del agua fría. Pasadas 24 horas se realizó el test de natación forzada adaptada. Esta vez el agua estaba a 21°C y con un volumen suficiente de agua que obligaba a nadar al ratón durante los 6 minutos de la prueba (ver Figura M.4). Durante este tiempo, el animal luchó para encontrar una salida del recipiente sin éxito debido a las características del propio cubo, con la intención de que esto le generase estrés psicológico agudo. Finalmente se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días posteriores al FST.



**Figura M. 4. Prueba adaptada de natación forzada (FST, forced swim test).** 1) 6 minutos en agua a 37°C, con apoyo en el suelo del recipiente 2) 6 minutos en agua a 21°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), con apoyo en el suelo del recipiente 3) 6 minutos en agua a 21°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), sin apoyo en el suelo del recipiente. *Fuente:* Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

### **3.4.3.- Privación de comida y agua.**

Es un procedimiento sencillo que únicamente consistió dejar el animal durante 24 horas sin comida y el agua. Aunque aislamos a los animales de forma individualizada para evitar que el contexto social durante la aplicación del estrés suponga un factor añadido, la práctica de esta prueba se realizó en jaulas estándar habituales de contención de estos animales, manteniendo el ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, bajo las condiciones controlables del laboratorio (a una temperatura ambiente de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de 55%), y de esta forma se evitó añadir un estímulo nuevo a la intervención. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días después de la privación de alimento y agua.

### **3.4.4.- Aislamiento social en jaula metabólica.**

La jaula metabólica convencional permite un aislamiento social, y genera una alteración de la actividad metabólica del animal evitando cualquier tipo de artefacto conductual, en gran parte porque todos los componentes situados debajo de la propia jaula son desmontables. Diseñadas y fabricadas por TECNIPLAST®, sus dimensiones cumplen con la normativa vigente para el bienestar del animal. La jaula consta de un habitáculo superior de paredes lisas con  $320\text{ cm}^2$  de superficie y 14 cm de alto. A pesar de que se han descrito varios modelos de jaulas metabólicas y que se usan comúnmente para alojar animales en el laboratorio, estudios previos en roedores han determinado y evaluado, mediante pruebas conductuales y fisiológicas, las distintas respuestas al estrés que produce el alojamiento del animal en un espacio tan característico, constituyéndolo como factor estresante único (Gil y cols., 1999; Eriksson y cols., 2004; Whittaker y cols., 2016).

Este tipo de estrés se basó en aislar por separado a los animales durante un primer período de 24 horas, y se amplió, al igual que la inmovilización, con una segunda secuencia en la que el confinamiento se realizó durante 24 horas también, pero en un período de 5 días consecutivos, con el objetivo de poder identificar una posible habituación del animal al factor estresante aplicado. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días posteriores del aislamiento.

### **3.4.5.- Ultrasonidos.**

Todos los animales fueron alojados individualmente en las jaulas estándar que ya se encuentran habitualmente y, siguiendo las mismas condiciones ambientales y contextuales que durante la aplicación del estrés por privación de comida y agua, pero con la diferencia que en esta ocasión los alimentos y el agua estaban disponibles *ad libitum*. El dispositivo ultrasónico utilizado (Weitech, Wavre, Bélgica) fue dispuesto en una sala completamente aislada del laboratorio, y se utilizó un programa en un rango de frecuencia bajo, de 20-25 kHz, y una intensidad promedio de 50 dB. El ruido aplicado no era continuo, sino que su aplicación se alternaba aproximadamente cada 15-30 segundos de forma aleatoria, para evitar que el estímulo fuera previsible por parte del animal. Inicialmente, esta metodología se aplicó durante un período de 3 horas con la idea no exponer a los animales a tiempos largos ya descritos en este tipo de procedimientos, y que pueden terminar generando rasgos y comportamientos depresivos al animal (Pavlov y cols., 2019). Este tiempo resultó insuficiente para aumentar la liberación espontánea de ACh (ver el apartado 4.5 de resultados) y se amplió el período de exposición a 24 horas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días después del estrés específico mediante ultrasonidos.

### **3.4.6.- Exposición a estresores secuenciales.**

Una vez establecida una serie de factores estresantes agudos que cumplan los requisitos de generar cambios similares, tanto en la afectación en el comportamiento del animal, como en el incremento de su actividad neuromuscular, se compone una secuencia con el objetivo de inducir estrés psicológico crónico al animal. Se pretende que el animal no sea capaz de poder asumir tantos estímulos nuevos en un período relativamente corto de tiempo, es decir, que no pueda habituarse. De esta forma se puede advertir si estos cambios observados anteriormente son capaces de mantenerse en el tiempo. El protocolo esquemático del procedimiento y las fases en las que se ha dividido este factor estresante combinado se visualiza detalladamente en la Figura M.5. La duración del programa es de un total de 10 días. En el apartado correspondiente de la *Discusión* (5.9) se razona esta secuencia de factores estresores. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 3 días, 7 días y 15 días después de la aplicación del estrés variado.

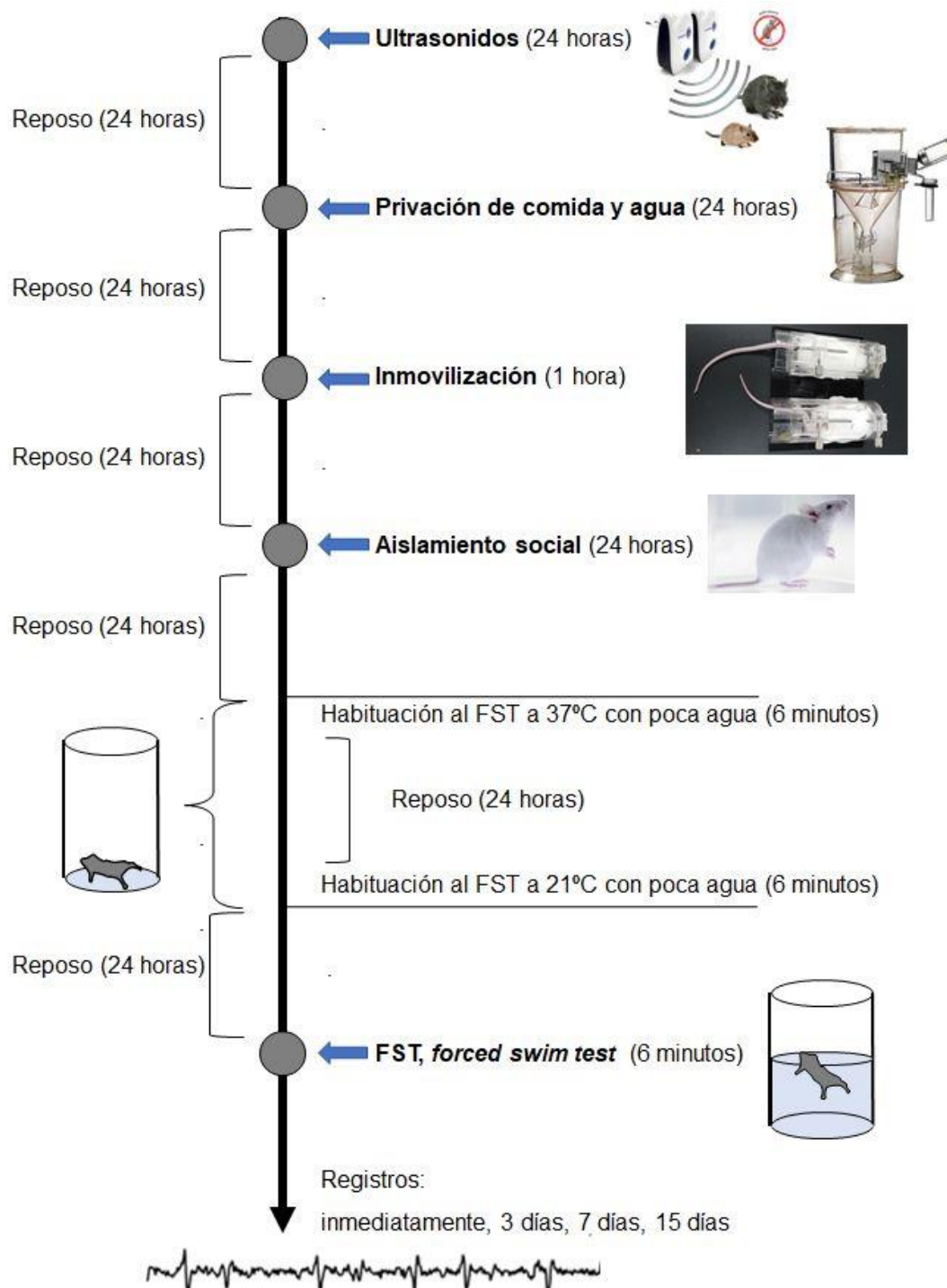


Figura M. 5. Desglose del protocolo utilizado para la exposición a estresores secuenciales".

### **3.5.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE ANIMALES.**

Aunque durante todos los experimentos se ha procurado el máximo esmero en la calidad de vida de los animales utilizados, usando solo el mínimo número de animales imprescindibles para completar cada una de las fases de este trabajo. Sin embargo, en ocasiones ha sido necesario excluir algunos ratones. Predefinir esta situación antes de comenzar el estudio ha sido relevante para poder evitar errores o confusiones de interpretación.

#### **3.5.1- Exclusión durante los procedimientos estresores.**

Durante la realización o período posterior a la aplicación de estrés es necesario observar signos característicos de estrés como aumento del ritmo cardíaco, aumento de la agresividad, temblores, “*frezzing*” (respuesta de congelación) con el erizamiento del pelo correspondiente, posición de defensa o limitación del movimiento. Los animales que no mostraron estos signos fueron retirados del estudio (un total de 8).

Por otro lado, durante la realización o período posterior a la aplicación de estrés algunos animales mostraron síntomas de anhedonia o depresión (un total de 5). Esto es muy evidente en la prueba del “estrés por adaptación de la prueba de natación forzada o prueba de Porsolt (FST, *forced swim test*)”. Se observó que algunos animales limitaban su movilidad, dejaban de nadar e incluso, se quedaban flotando, abandonando cualquier opción de lucha y resistencia a la situación planteada. Aquellos animales que presentaron inmovilidad o cese de actividad durante la natación fueron excluidos. La medición de su cese de actividad se realizó por observación directa siguiendo el siguiente criterio; el experimentador registró el tiempo (en segundos) que el roedor permaneció inmóvil flotando en el agua, o realizando la cantidad mínima de movimiento para mantenerse a flote con la cabeza erguida por encima del agua (Porsolt y cols., 1977b). Si el tiempo superaba los 30 segundos, controlando siempre que el animal no se ahogase, este era descartado completamente del experimento. El número de animales retirados fue de 2 durante la fase experimental del estrés agudo, y de 3 durante la fase de combinación de estresores.

#### **3.5.2- Exclusión durante la aplicación de técnicas electrosisiológicas.**

Durante la disección es posible observar variaciones anatómicas en los patrones de inervación o en la disposición de las fibras musculares del LAL

(ocasionalmente hay haces en dirección transversal). Estas pueden dificultar los registros electrofisiológicos.

### **3.6.- REGISTRO INTRACELULAR.**

#### **3.6.1.- Conceptos básicos.**

El registro intracelular es una técnica que permite interpretar la actividad neuromuscular de cada fibra, de forma aislada. Concretamente para nuestra investigación, su utilidad reside en conocer el intercambio iónico que se produce en el citoplasma de los miocitos estudiados. De esta forma se consigue reproducir la fisiología neuromuscular posterior a una situación de estrés específica. Todo esto, mediante la previa extracción del músculo correspondiente (“ex vivo”), y posterior estabilización de este en una cámara de registro que contiene una solución Ringer para poder mantener el LAL vivo y en perfectas condiciones (“in vitro”).

En todos los experimentos realizados, se lleva a cabo el registro intracelular a partir de la introducción de un electrodo de registro en el citoplasma de la célula muscular pertinente, y se estudia la respuesta espontánea que se traduce. La ventaja de este tipo de actividad espontánea es que no precisa del bloqueo de la contracción muscular, ni de la activación del potencial de acción axonal por parte de la unidad estimuladora del aparato, sino que simplemente es necesaria la grabación de los cambios que por sí solos se van produciendo. Esta neurotransmisión se caracteriza por la liberación de las vesículas de acetilcolina (ACh) de forma estocástica, sin el requerimiento de un potencial de acción, ya que se cree que la dispensación de los paquetes de neurotransmisores tiene roles muy concretos para un correcto desarrollo y función tanto de los circuitos neuronales como de la propia estructura muscular (Kavalali y cols., 2011; Peled y cols., 2014).

#### **3.6.2.- Componentes del equipo de electrofisiología utilizado.**

Como se ha comentado, el principal objetivo de las técnicas electrofisiológicas es el de registrar artificialmente la fisiología de la neurotransmisión espontánea y en distintas condiciones experimentales. Por lo tanto, en el presente modelo neuromuscular y, teniendo en cuenta la información que queremos analizar, es

necesario que el aparato conste de un sistema sofisticado de registro para obtener la respuesta que se genera posterior a la aplicación del estrés.

### **3.6.2.1.- Electrodo de borosilicato para registro intracelular.**

El electrodo que se introduce dentro del citoplasma de la fibra muscular para registrar la actividad del contacto sináptico tiene que ser de unas dimensiones muy concretas. Por ejemplo, en el músculo sóleo, el diámetro promedio de las fibras musculares es de 44  $\mu\text{m}$  en fibras tipo I (o fibras de contracción lenta), mientras que es de aproximadamente 37  $\mu\text{m}$  en fibras tipo IIA (o fibras de contracción rápida; Dimov y Dimov, 2007). El músculo LAL del ratón es un músculo predominantemente rápido, y de dimensiones muy reducidas (Erzen y cols., 2000). Por lo tanto, para poder trabajar en perfectas condiciones, y poder acercarnos el máximo posible al contacto sináptico, será necesaria la utilización de un electrodo con un diámetro interno de 1  $\mu\text{m}$ , y de esta forma, también poder preservar la membrana en el momento que este se introduzca en el medio citoplasmático. Este electrodo se consigue a partir de un capilar de borosilicato (GC150F-10, *Harvard Apparatus Ltd.*, diámetro interno 0,86 mm, diámetro externo 1,5 mm) con un "Puller" (The P-97 Flaming/Brown type micropipette puller, Sutter Instrument ®, U.S.A.). Este aparato calienta el capilar y lo estira, fundiendo el centro hasta formar dos electrodos de registro con una punta de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y una resistencia de 40  $\text{M}\Omega$ , ideal para trabajar intracelularmente. Una vez conseguido, se rellena con una solución de cloruro de potasio (KCl) 3 M.

### **3.6.2.2.- Electrodo de plata de registro.**

Este electrodo queda introducido en el espacio interior libre del capilar de borosilicato donde se encuentra la solución de KCl. Se trata de un filamento de plata pura envuelto de cloruro de plata (AgCl) y que sirve para conectar el electrodo de borosilicato con el amplificador. Para recubrir de cloruro de plata estos filamentos se recurre a la electrólisis que consiste en una reacción química no espontánea mediante la oxidación de un hilo de plata en KCl 2 M mediante corriente eléctrica. Para ello, requeriremos un generador de corriente continua diseñado para tal efecto (ACL-01, serie nº 0090018; npi electronic GmbH, Tamm, Germany). El primer paso consistió en lijar el filamento de plata, para eliminar todas las impurezas y óxidos; seguidamente, dentro de un vaso de precipitado de 250 ml, se añadió la solución de KCl 2M, y se colocó en el centro un hilo de plata en el ánodo y a continuación se sumergió el electrodo de plata en el cátodo de manera que quedase en el centro del vasos in tocar

el hilo de plata, y se conectó el polo positivo del generador DC al electrodo, mientras que el polo negativo se conectó al hilo de plata enrollado; posteriormente se aplicó un voltaje de 9V durante 6 minutos y 15 segundos. La reacción de oxidación libera hidrógeno que se puede observar por la presencia de burbujas alrededor del electrodo. Para comprobar si la cloruración es correcta fue usado un Multivoltímetro digital Velleman DVM92 (Velleman NV, Gavere, Belgium).

#### **3.6.2.3.- Electrodo de referencia extracelular.**

Se trata de otro filamento de plata clorurado que se encuentra sumergido en Ringer normal en un espacio específico independiente a la cámara de registro donde se encuentra la muestra. Las dos cámaras están conectadas mediante un puente de agar (3,5% agar en 137 mM NaCl). Este electrodo permite conocer el estado del medio extracelular comparado con las modificaciones que se producen en el medio intracelular durante el transcurso del experimento.

#### **3.6.2.4.- Multivoltímetro.**

Este aparato, que también se encuentra conectado al electrodo de registro (ver el número 3 de la Figura M.6.), nos muestra las variaciones del potencial de membrana a tiempo real. Como veremos más adelante, se deben seleccionar aquellas fibras con el potencial de membrana menor a -50 milivoltios (mV), y durante el tiempo de registro, solamente quedarse los resultados de aquellas fibras que no varíen más de 5 mV (tanto en positivo como en negativo); estas modificaciones se pueden producir, por ejemplo, por rasgar la membrana del miocito y que se escapen iones, entre otras situaciones variables que hay que tener en cuenta para no sesgar los resultados.

#### **3.6.2.5.- Tabla digitalizadora (DIGIDATA 1322<sup>a</sup>, Interface, Axon Instrument Inc., Weatherford, TX, EUA).**

La señal que genera el sistema de registro es en formato analógico y debe de ser digitalizada para poder seguir con el análisis informático.

#### **3.6.2.6.- Soft informático (Axoscope 10.2).**

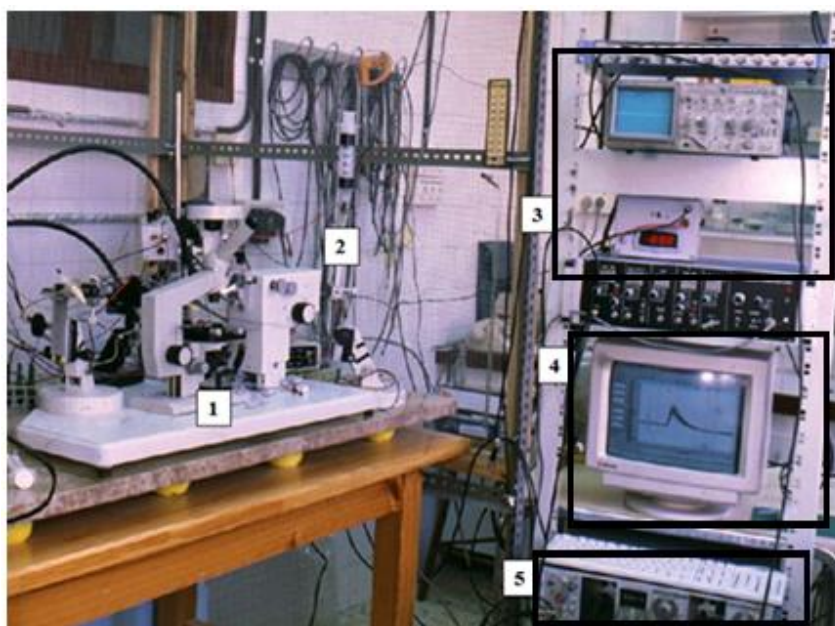
Este software específico para registro intracelular permite su uso como un osciloscopio y, además, las señales digitalizadas y almacenadas pueden ser individualmente analizadas. Ver el número 4 de la Figura M.6.



### 3.6.2.7.- Amplificador.

El electrodo de registro está conectado a un sistema de amplificación diferencial (Tecktronics, AMS02, Tektronix, Inc., Beaverton, OR, EUA). Este procedimiento permite la incrementación de la señal captada, multiplicándola por 10 en los experimentos realizados en esta tesis. Ver el número 5 de la Figura M.6.

Todo el equipo electrofisiológico completo se muestra en la Figura M.6. Este complejo sistema se encuentra ubicado sobre de una mesa antivibratoria, esencial para minimizar todas aquellas perturbaciones mecánicas del propio entorno de trabajo. Esta, además, se encuentra sujeta mediante un micromanipulador asociado a un microscopio, y una zona especialmente diseñada para disponer la muestra de músculo. Rodeando el conjunto, una caja de Faraday, compuesta de un material metálico conductor para bloquear las posibles interferencias electromagnéticas.



**Figura M. 6. Sistema básico d'electrofisiología para el registro intracelular.** 1) Microscopio y zona de colocación de la muestra; 2) Micromanipulador y unidad aisladora; 3) Multivoltímetro y tabla digitalizadora; 4) Sistema informático (Axoscope 10.2); 5) Amplificador. Fuente: Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

### 3.6.3.- Procedimiento para el registro electrofisiológico intracelular.

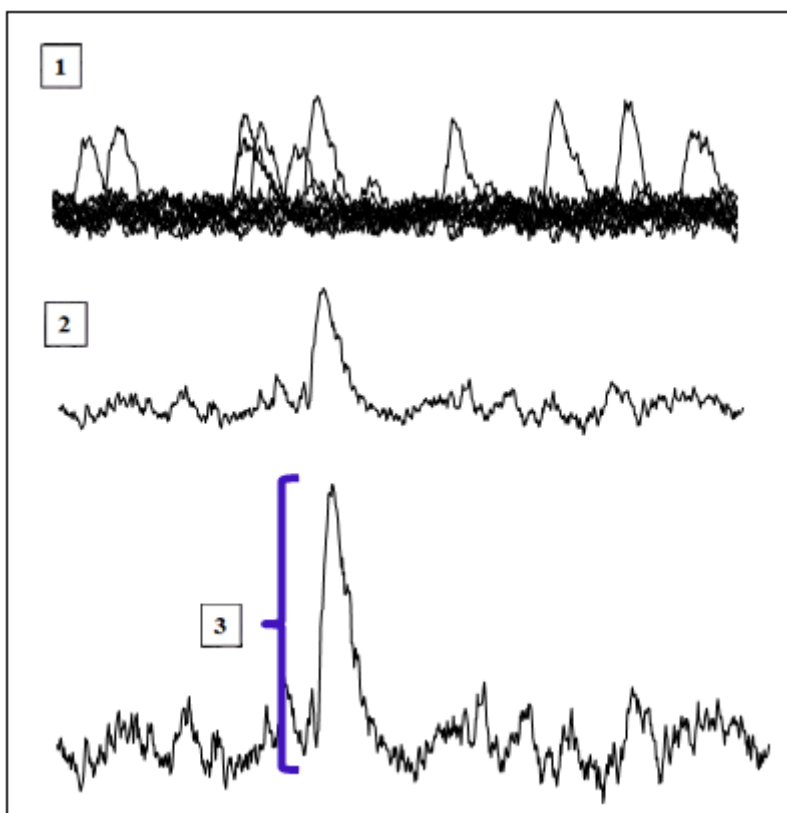
Durante el desarrollo de los experimentos de electrofisiología realizados en este trabajo, y con la finalidad de mantener el músculo LAL vivo y en perfectas condiciones se disecciona el tejido muscular junto con su inervación según se ha comentado anteriormente (ver en apartado 3.3 de esta sección), y se coloca en una

placa de Petri recubierta de Sylgard®, quedando todo sumergido en Ringer normal (ver composición en la Tabla M.1.), y con un burbujeo constante de carbógeno (95% d'O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) para su correcta oxigenación. Para minimizar las alteraciones durante la disección, y la vibración durante el registro, el burbujeo no se aplica directamente sobre la placa de Petri ni sobre la cámara de registro, sino que se adapta en la solución apartada, y se va recambiando el contenido que rodea a la muestra secuencialmente, cada 15-30 minutos.

Es habitual esperar un tiempo prudencial antes de realizar el primer registro, alrededor de 10-20 minutos; por un lado para hacer un primer cambio de Ringer (teniendo en cuenta que, durante la disección, habrá rotura de membranas, capilares, terminaciones nerviosas, entre otros componentes, y por lo tanto, liberación de sustancias a nivel extracelular que pueden alterar las condiciones del músculo mientras se encuentra en la cámara de registro), y por otro lado, para dar tiempo al contenido de KCl de los electrodos a asentarse correctamente (sin burbujas que pueden actuar como artefactos durante el registro). Transcurrido este tiempo, se selecciona la fibra adecuada mediante la introducción del electrodo dentro del citoplasma de un miocito. Para este movimiento, se precisa de la participación de un micromanipulador. Al mismo tiempo, con la ayuda de un microscopio, se consigue determinar en cada momento cual es el área seleccionada para el registro, y la dirección que hay que tomar para seguir un patrón correcto de estudio. Es muy importante que su potencial de membrana sea  $\leq -50$  mV. Además, durante el registro este potencial no puede variar más de 5 mV (en la mayoría de las ocasiones tiende a caer, pero a veces, puede verse incrementando, por cambios en la resistencia del electrodo por adherencia de esfacelos). En el caso que no se cumplan estos dos requisitos, el registro de la fibra queda descartado, y se repite el proceso en otra área. En el caso que sí se cumplan los criterios, hay que confirmar que existan eventos mEPPs ("miniature end plate potential" o mEPPs; ver Figura M.7) con un tiempo de subida mínimo de 1 ms (lapsus de tiempo existente entre el inicio y el pico del evento), y una amplitud mínima de 0,4 mV (correspondiente a la distancia desde la línea de base del registro hasta su punto álgido). Uno de los motivos más típicos de descarte de un registro en este punto es el de encontrarse alejado de la zona donde hay el contacto sináptico. En estas situaciones, la actividad neuromuscular, al producirse lejos de la zona de registro, queda sesgada (ya que los eventos que se podrán visualizar en la pantalla serán aparentemente más pequeños o directamente no se podrán apreciar). Sin estas condiciones comentadas, o si el primero de los mEPPs no sale de forma espontánea dentro de los 10 primeros segundos por cada fibra evaluada, el registro también queda anulado. En el momento que se cumplen todas

estas circunstancias, la fibra muscular es válida para su registro de mEPPs durante 1 minuto. Por cada experimento realizado se registra un mínimo de 15 fibras, y estos se comparan con los resultados control realizados previamente en otros músculos LAL (actualizados continuamente) siguiendo el mismo procedimiento, recorriendo la misma zona y áreas de inervación, con las mismas condiciones ambientales y contexto, pero en nuestro caso, sin la aplicación de ningún proceso estresante.

En todos los experimentos se recambia el Ringer cada 15-30 minutos, con el objetivo principal de mantener viva la muestra en todo momento. Se han utilizado un mínimo de 3 músculos por cada tipo de experimento estudiado. Además, en todos ellos, la temperatura y la humedad en el área de trabajo se mantienen constantes y monitorizados, estableciendo unos gradientes estables de 26°C ( $\pm$  2°C), y 50% respectivamente, y así evitar las diferencias de temperatura entre los ensayos realizados en distintas épocas del año.



**Figura M. 7. Registros intracelulares de mEPPs.** 1) Varios eventos consecutivos registrados pertenecientes a un mismo contacto sináptico superpuestos, tal como se visualiza habitualmente en el osciloscopio. 2) Ejemplo de un mEPP aislado que permite evidenciar que presenta unas características muy similares a las del EPP. 3) Amplitud (expresada en mV), correspondiente a la distancia desde la base del potencial hasta el punto máximo del episodio. Fuente: Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

### **3.6.4.- Parámetros evaluados.**

#### **3.6.4.1.- Potencial de membrana.**

La determinación del potencial de membrana se efectúa tanto durante el registro de los episodios de los experimentos control, como de los experimentos de estrés. Como hemos comentado más arriba, tiene que ser siempre  $\leq -50$  mV y se debe procurar que no presente una variación de 5 mV en el transcurso de la grabación. Si se visualiza una caída del potencial muy evidente a medida que va transcurriendo el experimento, puede ser significativo que la muestra se ha degradado, o bien que la membrana está en mal estado. Es muy útil, el hecho de hacer una comparación entre los distintos potenciales de los distintos experimentos, para poder averiguar la causa de una posible variación significativa. Alteraciones en el electrodo de registro (aunque se recambia regularmente), alteraciones o contaminaciones en las soluciones utilizadas (como el Ringer), o daños del músculo durante el proceso de disección, son varios ejemplos habituales que se pueden producir durante el procedimiento electrofisiológico, y una detección precoz de estos errores puede evitar sesgos en el análisis experimental final.

#### **3.6.4.2.- Frecuencia de los mEPPs.**

La frecuencia de los potenciales de placa espontáneos corresponde a la cantidad de episodios que aparecen durante el minuto que dura el registro intracelular. Esta información nos enseña cambios que se producen a nivel presináptico; en nuestro caso, concretamente, pertenece al número de vesículas de acetilcolina que se liberan estocásticamente. La frecuencia se expresa en eventos por minuto.

#### **3.6.4.3.- Amplitud de los mEPPs.**

La amplitud de los potenciales de placa espontáneos, como ya se ha explicado anteriormente, consiste en la altura desde la línea de base del propio potencial hasta el punto máximo del episodio. En este caso, su medición nos da una valiosa información sobre el estado del componente postsináptico de la fibra. Por ejemplo, una amplitud pequeña puede significar que nos encontramos lejos de la unión neuromuscular (sobre todo con un tiempo de subida largo), o en caso contrario, una amplitud inexplicablemente grande puede indicarnos alteraciones en alguno de los componentes que están trabajando (por ejemplo, una contaminación de la solución

Ringer). Se expresa en mV (milivoltios), haciendo un promedio final de los eventos que aparecen durante el minuto que dura la grabación.

### 3.6.5.- Análisis estadístico.

Para interpretar los episodios registrados durante el experimento de electrofisiología, se ha utilizado en un primer momento, el sistema informático Axoscope 10.2. Con este software utilizado para almacenar los eventos en el ordenador, se puede además analizar individualmente cada fibra, eliminando artefactos y eventos no significativos que puedan haber superado el filtro del registro. Para el análisis final de los datos se ha usado en un primer momento, Microsoft Excel<sup>®</sup>, y posteriormente el software estadístico SPSS<sup>®</sup> v19,0. Los valores se han expresado como media  $\pm$  SEM, y también como % de variación, definido como [valor final / valor inicial] x 100. Se utilizó la prueba *Student's t-test* para la comparación de las diferencias existentes entre el grupo control y el grupo experimento. La significación entre resultados se estableció en  $P < 0,05$ .

De forma resumida, esta técnica electrofisiológica nos permite entender y reconocer los cambios que se producen en la actividad neuromuscular intracelular, evaluando la neurotransmisión espontánea que se produce posterior a un estímulo estresante, y comparando estos resultados con las otras técnicas expuestas para ver si se puede establecer un patrón de relación con algunas de las características típicas presentes en el SDM.

Tabla M. 1. Materiales y soluciones utilizadas durante los experimentos electrofisiológicos.

Materiales y soluciones químicas utilizadas
<b>Tribromoethanol (TBE) 2%</b> (2 g de 2, 2, 2-Tribromoethanol por cada 100 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada): solución anestésica para el ratón (0,15 ml de TBE por cada 10 g de peso del animal).
<b>Solución fisiológica Ringer</b> (proporciones correspondientes a 1 litro, a enrasar todo mediante H <sub>2</sub> O bidestilada): NaCl 1M, KCl 0,5M, NaHCO <sub>3</sub> 0,5M, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1M, CaCl <sub>2</sub> 0,2M, MgSO <sub>4</sub> 0,1M; antes de ser utilizada, se añade también glucosa 11 mM (0,218 g por cada 100 ml de solución "Ringer", y (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO > 99,5%.
<b>Carbógeno</b> : Sistema de burbujeo constante para oxigenar la muestra (95% de O <sub>2</sub> y 5% de CO <sub>2</sub> ).

**Utilillaje para la disección del LAL:** Lupa binocular estereoscópica, matraz aforado de 100 ml, instrumentación microquirúrgica (pinzas, tijeras), vaso de precipitados, placa de Petri recubierta de Sylgard®, pipetas, puntas de pipetas de un solo uso, agujas entomológicas.

**Cámara de registro:** Camarilla de 1,5 ml, especialmente diseñada para el registro electrofisiológico.

**Electrodo de registro de vidrio:** Capilar de borosilicato convencional (GC150F-10, *Harvard Apparatus Ltd.*, diámetro interno 0,86 mm, diámetro externo 1,5 mm).

**Electrodo de registro de plata:** Filamento de plata, previamente clorurado (mediante KCl 2 M); sirve para conectar el primer electrodo con el aparato de electrofisiología.

**Electrodo de referencia extracelular (Ag-AgCl):** Filamento de plata, de forma helicoidal, y previamente clorurado también; sirve para conocer el estado del medio extracelular y compararlo con los cambios intracelulares durante el experimento.

**Puente de agar (3,5% agar en 137 mM NaCl):** Puente de conexión entre el músculo y el electrodo de referencia.

**“Puller” (The P-97 Flaming/Brown type micropipette puller, Sutter Instrument®, U.S.A.):** Este aparato calienta el capilar, y lo estira, deshaciendo el centro hasta formar dos electrodos de registro con una punta de aproximadamente 1µm y una resistencia de 20-40 MΩ, ideal para trabajar intracelularmente.

**Generador de corriente continua (ACL-01, serie nº 0090018; npi electronic GmbH, Tamm, Germany):** Aparato para clorurar el electrodo de plata de registro

**Multivoltímetro digital Velleman DVM92 (Velleman NV, Gavere, Belgium):** Permite la comprobación de una correcta cloruración por parte del electrodo de plata de registro.

**Temporizador electrónico:** Necesario para el control de los tiempos de cloruración, recambio de Ringer y disección, principalmente.

**Equipo completo de electrofisiología:** Microscopio y zona de colocación de la muestra, micromanipulador y unidad aisladora, amplificador (Tecktronics, AMS02, *Tektronix, Inc., Beaverton, OR, EUA*), multivoltímetro, tabla digitalizadora (DIGIDATA 1322<sup>a</sup>, *Interface, Axon Instrument Inc., Weatherford, TX, EUA*), sistemas informáticos (software Axoscope 10.2, Microsoft Excel®, y software estadístico SPSS® v19,0).

### 3.7.- REGISTRO ELECTROMIOGRÁFICO.

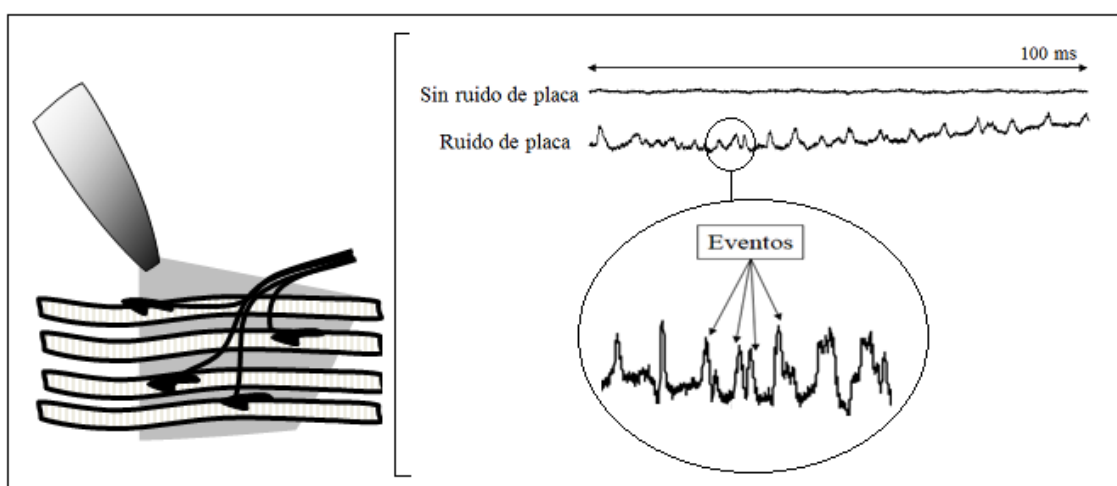
#### 3.7.1.- Conceptos básicos.

Mediante electromiografía de aguja concéntrica, podemos registrar la actividad eléctrica espontánea (AEE), y, por lo tanto, nos da mucha información sobre la actividad neuromuscular en reposo del músculo en su conjunto. Esta metodología

permite evaluar distintas actividades de una misma zona en períodos de tiempo y situaciones distintas a lo largo de la vida del animal con el objetivo de determinar aumentos, disminuciones y/o variaciones en la función muscular. Con el uso de este procedimiento, no se requiere la extracción del músculo correspondiente, es una técnica *in vivo - in toto*.

En todos los experimentos se realiza un registro en este caso extracelular a partir de la inserción de una aguja de registro en la zona adyacente a un área donde haya concentración de contactos sinápticos, pero sin llegar nunca a entrar en contacto con el músculo a evaluar, ya que una lesión del tejido alteraría por completo la información de la grabación. Esta actividad se refleja como el ruido de placa.

La representación electromiográfica del ruido de placa consiste en una anfractuosidad de la línea de base, y que se produce teóricamente al acercarse, mediante el electrodo de registro, a la zona conocida como "sitio activo". Esta señal eléctrica se transduce a sonido y recuerda el oleaje del mar. Su frecuencia se puede analizar con la ayuda de un contador de frecuencia digital. El ruido de placa está compuesto por una serie de eventos que por su distribución recuerdan claramente a los episodios obtenidos durante el registro intracelular; al igual que la neurotransmisión espontánea, representa la actividad de la despolarización de la placa motora por la liberación basal de acetilcolina, pero en el caso del ruido corresponde a la lectura de un sumatorio de fibras musculares a la vez (ya que la información es extracelular), mientras que los mEPPs solamente corresponden al análisis de una única fibra muscular. En la Figura M.8 se muestran ejemplos de este ruido de placa.



**Figura M. 8. Registro electromiográfico.** En la izquierda, esquema de como se realizan los registros cerca de los sitios activos. En la parte derecha de la imagen se muestra la línea de base plana cuando no aparece ruido de placa, y con anfractuosidades cuando sí aparecen los eventos, dando esta forma tan característica de picos seguidos (el número de eventos es directamente proporcional con la frecuencia del ruido correspondiente). *Fuente:* Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

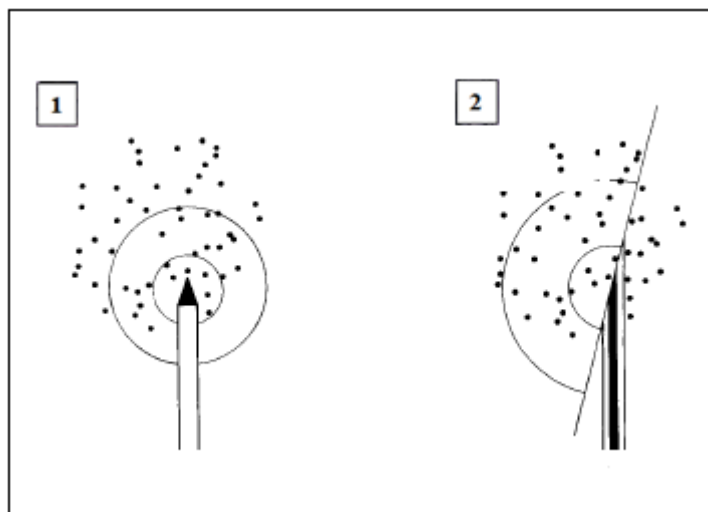
### **3.7.2.- Composición del equipo de electromiografía utilizado.**

Al igual que sucede con las otras técnicas electrofisiológicas convencionales la finalidad de esta metodología es la de extrapolar la información fisiológica obtenida del músculo y compararla en distintas situaciones experimentales. El equipo de electromiografía usado consta de los siguientes elementos.

#### **3.7.2.1.- Electrodo de aguja monopolar (*Natus Manufacturing Limited*).**

Este electrodo de registro específico extracelular consiste en un alambre sólido de acero inoxidable, de unos 0,4 mm de diámetro, recubierto con teflón excepto en su punta, empleado en electromiografía para registro de las diferencias de potencial entre el electrodo de referencia y el área activa del electrodo en la punta no aislada (insertada en este caso al músculo a registrar). Con este sistema se facilita la captación de la actividad de varias fibras musculares. En este caso, a diferencia del registro intracelular, el electrodo no tiene que adaptarse a las medidas celulares del miocito, ya que la información se obtiene de varios de ellos a la vez, y sin la necesidad de atravesar su citoplasma. Aunque también es posible utilizar un electrodo de aguja concéntrica por su similitud y su forma de uso (Howard y cols., 1988) (ver la descripción y estructura en la Figura M.9), la mayoría de los estudios que evalúan comparativamente los dos sistemas se decantan por el uso de las agujas monopolares. Estas agujas son más selectivas ya que no pueden registrar la actividad de las fibras más alejadas de la zona, y son mucho más eficientes captando información de las fibras más cercanas a su radio de actuación (Nandedkar y Sanders, 1991; Dumitru y cols., 1997). No obstante, también existen estudios que defienden en parte el papel de las agujas concéntricas, en las que destacan su capacidad para detectar más sitios con actividad espontánea, pero al mismo tiempo sugieren que el aumento de lesión tisular que provoca su estructura biselada podría explicar tanto su mayor sensibilidad encontrada como la incomodidad y la sensación dolorosa de los pacientes cuando experimentan su uso (Sherman y cols., 1990).





**Figura M. 9. Representación de un electrodo de aguja monopolar (1) y un electrodo de aguja concéntrico (2), juntamente con la distribución esquemática de las fibras musculares que pertenecen a una unidad motora. 1)** El electrodo monopolar tiene un territorio de registro circular, y aunque no es capaz de registrar la actividad de las fibras distantes, el límite redondo pequeño, contiene más cantidad de fibras captadas; **2)** El electrodo concéntrico, en cambio tiene un territorio de grabación semicircular, y aunque es capaz de quedarse con información de fibras distantes, tiene menos capacidad cuando se analiza información de su entorno más cercano. *Fuente:* Imagen extraída del estudio de Nandedkar y Sanders, 1991.

### **3.7.2.2.- Electrodo de referencia.**

Este segundo electrodo remoto acostumbra a ser otra aguja de acero inoxidable (básicamente un electrodo monopolar, pero sin aislamiento), insertada subcutáneamente en la pata o la cola.

### **3.7.2.3.- Equipo de electromiografía.**

El aparato utilizado es un electromiógrafo comercial (Medelec Mystro plus, GR20; Teca Medelec, London, UK).

### **3.7.2.4.- Contador de frecuencia.**

En este caso y para una correcta interpretación de la frecuencia del ruido de placa analizado, se utilizó un contador de frecuencia portátil mediante la aplicación para smartphone “*Audio Frequency Counter*”. Este dispositivo es capaz de medir la frecuencia fundamental de un sonido con una gran precisión (Murphy y King, 2016). El procedimiento fue muy simple; en el momento que se abre la aplicación se empieza a grabar el sonido recibido por el micrófono en un archivo de audio con la frecuencia de muestreo máxima que permita el smartphone utilizado durante el experimento (normalmente la mayoría de los dispositivos móviles tienen una muy parecida). Se pueden modificar los filtros para eliminar o minimizar artefactos no deseados en la señal obtenida. De todas formas, es importante advertir que, si en el entorno de

actuación o en sus proximidades existen ruidos varios, estos pueden interferir con el contador de frecuencia falseando los resultados. Por lo tanto fue imprescindible focalizar su funcionamiento en una sola señal, lo suficientemente alta para que el contador puede separarla del ruido de fondo y solo contar esta forma de onda, y realizarlo en un entorno de ruido bajo, aislado para poder evitar señales a veces imperceptibles, como la producida por las redes inalámbricas (cabe destacar que previamente se hacía una grabación del ruido de fondo con el objetivo de que esta señal se pudiera sustraer y diferenciar del ruido activo experimental, por eso es muy importante mantener una uniformidad del entorno). Partiendo de la base que la señal electromiográfica tiene que ser aproximadamente 10-15 veces más fuerte que cualquier otra señal que se encuentre en la misma área, y que es necesario que el contador esté físicamente cerca del ruido experimental, decidimos conectar la entrada de audio del smartphone a la salida de audio del aparato de electromiografía mediante un cable adaptado para esa finalidad. Existen estudios que apoyan el uso de smartphones como dispositivos de monitoreo y evaluación del ruido, por su efectividad, precisión, fácil manejo y bajo coste (Crossley y cols., 2020).

Tanto el equipo electromiográfico, como el contador de frecuencia se muestran en la Figura M.10. Su ubicación se encuentra en una sala aislada, para eliminar o al menos minimizar ruidos externos que puedan alterar el análisis de la frecuencia durante el experimento.

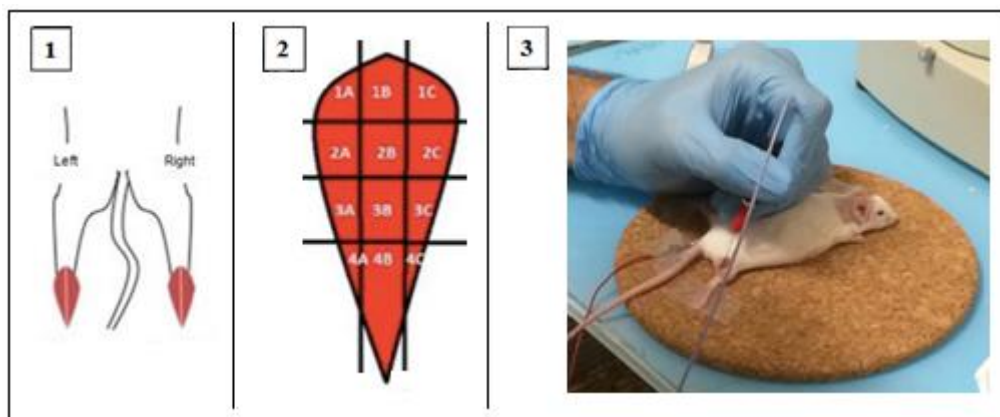


**Figura M. 10. Sistema d'electromiografía.** Desglose de los elementos principales. **1)** Electromiógrafo convencional (Medelec Mystro plus, GR20). Se muestra un ejemplo de ruido de placa; **2)** Contador de frecuencia (Audio Frequency Counter). *Fuente:* Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

### **3.7.3.- Procedimiento de registro electromiográfico.**

Las agujas monopolares convencionales registran una semiesfera de un radio de aproximado de 1mm (dentro de este volumen se encuentran alrededor de unas 100 fibras musculares; Mills, 2005). Recientemente, Yin y colaboradores (2019), realizaron una investigación muy completa de la distribución espacial de los terminales de placa motoras con el objetivo de comprender mejor la actividad neuromuscular. Establecieron un patrón laminar organizado, y en el que la integridad de este grupo de láminas permitía reflejar el estado funcional de los músculos. De esta forma, la cantidad de cientos de fibras musculares que pertenecen a una unidad motora se distribuyen ampliamente y de forma organizada en toda la sección transversal del músculo, y, por lo tanto, si no se mueve el electrodo y se centra el registro solamente en una región, sin marcar una distribución de actuación, es muy probable que no se consiga obtener la información correcta, ya que dentro del área escogida solamente habrá unas pocas fibras de una sola unidad motora. Por lo tanto, sabiendo que esta disposición de los terminales de placa motora puede afectar a los registros eléctricos obtenidos, y con el fin de asegurarnos de cubrir la totalidad del músculo durante el transcurso del análisis electromiográfico y no repetir zonas de ruido previamente exploradas, dividimos la estructura en 12 áreas virtuales tal como se puede ver en la Figura M.11. Este método fue inicialmente descrito por Prodanov y colaboradores (2005) que, mediante el ensamblaje de mapas tridimensionales de las placas terminales motoras de los músculos gastrocnemio medial y lateral, en la que su distribución se constituía en columnas a lo largo de su eje longitudinal, y dispuestas de proximal a distal.

En reposo se valora la denominada actividad eléctrica espontánea (AEE); los cambios evaluados en la frecuencia determinaran si esta actividad es anormal o no.



**Figura M. 11. Protocolo de registro EMG.** 1) Se utilizó la musculatura de las dos patas de cada animal para el registro, manteniendo siempre la izquierda para el control y la derecha para el experimento correspondiente; 2) La zona se divide en 12 áreas para que el registro resulte lo más completo posible; 3) Fase de registro EMG de la pierna experimental derecha en un roedor previamente anestesiado. *Fuente:* Archivo de imágenes de la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV.

Para el correcto progreso de los experimentos de electromiografía es importante una cierta preparación de la zona muscular a registrar. Por este motivo, cuando el animal ya se encuentra bajo los efectos de la anestesia, se procede a abrir la piel y la aponeurosis (ver utillaje en la Tabla M.2) de la parte posterior de la pierna del ratón, procurando no dañar los vasos o los músculos adyacentes a la zona, ya que el sangrado repercute negativamente en los registros. El siguiente paso es fijar las extremidades del animal, para evitar movimientos involuntarios que puedan producir algún tipo de sesgo en la señal, y se procede al registro. La aguja se inserta lentamente en el músculo, intentando producir el mínimo daño posible, y una vez dentro, se rota para grabar en todas las direcciones posibles. El avance con el electrodo dependerá del momento en que se empiece a escuchar el cambio de ruido que nos indique el sitio de registro correcto. Hay que tener en cuenta que el momento de transición con el ruido representa un desplazamiento mínimo de la aguja, una simple presión lateral en el eje de esta puede ser suficiente para que la actividad eléctrica aumente o disminuya, y por lo tanto es básico evitar movimientos bruscos durante su ejecución. También es muy importante repetir siempre el mismo patrón, siempre desde las áreas más inferiores hacia las más superiores, y de los extremos al centro del músculo; de esta forma, conseguimos evitar dañar los puntos nerviosos y vasculares más proximales, al menos hasta concluir el experimento. Finalmente, se evalúa la pantalla del electromiógrafo, y si la señal es correcta (sin artefactos o alteraciones que sea indicio de alguna patología), se procede a grabar el ruido de placa.

Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera: 1) registro control de la parte posterior de la pierna izquierda del ratón, 2) procedimiento de estrés una

vez el animal se encuentra recuperado de este primer registro, 3) examinación experimental de la parte posterior de la pierna derecha del animal. Los registros EMG siempre se obtuvieron utilizando un mínimo de 3 músculos por cada tipo de estrés estudiado. Además, en todos ellos, la temperatura y la humedad en el área de trabajo se mantienen lo más constantes posibles para evitar estas variables inter e intraindividuales, estableciendo unos gradientes estables de entre 22 y 26°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), y 50% respectivamente (Margalef y cols., 2019). Con el objetivo de comprobar si el registro obtenido es fiable se realizaron, previamente a los experimentos, controles de todo el procedimiento EMG, pero sin aplicar ningún tipo de estresor. El procedimiento para estos experimentos sham fue un primer registro de la parte posterior de la pierna izquierda del ratón, y se esperaron 12 horas para registrar la pata derecha del animal (% del control:  $101,06 \pm 0,90$ , N = 3 animales).

### **3.7.4.- Parámetros evaluados.**

#### **3.7.4.1.- Número de áreas con ruido de placa.**

Partiendo de la base que dividimos previamente el músculo en 12 cuadrantes imaginarios para abarcar por completo todas las regiones del músculo (ver Figura M.9), se realiza un recuento del número de áreas que presentan un aumento significativo y electromiográficamente cuantificable de su actividad eléctrica espontánea (ruido de placa). Este dato es comparado con las áreas activas encontradas en la pierna control del mismo animal.

#### **3.7.4.2.- Frecuencia de los eventos en el ruido de placa.**

La frecuencia del ruido de placa corresponde al número de eventos que aparecen durante el tiempo determinado que dura el registro extracelular, y fue obtenida mediante la aplicación para smartphone “*Audio Frequency Counter*”. Esta información, al igual que con la electrofisiología, nos muestra variaciones generadas a nivel presináptico, pero con la diferencia que esta vez corresponde a un grupo de varias fibras musculares, y no solamente a un solo miocito. La frecuencia se expresa en Hz (hercios).

Alteraciones en el electrodo de registro (que es conveniente ir recambiando regularmente), interferencias en la frecuencia por otros ruidos ambientales o lesiones durante el proceso de grabación, entre otros, pueden ser algunas de las causas más

habituales que pueden interferir en la correcta captación de las señales y que será preciso evitar o al menos minimizar.

### 3.7.5.- Análisis estadístico.

Para interpretar los eventos registrados durante los experimentos electromiográficos se usó en un primer momento Microsoft Excel® para recabar los datos y posteriormente el software estadístico SPSS® v19,0. Los valores se han expresado como media  $\pm$  SEM. Los resultados se expresaron como % de variación, definido como  $[\text{valor final} / \text{valor inicial}] \times 100$ . Se utilizó la prueba *Student's t-test* para la comparación de las diferencias existentes entre el grupo control y el grupo experimento. La significación entre resultados se estableció en  $P < 0,05$ .

A modo de resumen, la electromiografía nos permite identificar cambios que se producen en la actividad neuromuscular desde un punto de vista extracelular, que deberían seguir una tendencia parecida a la encontrada mediante los experimentos electrofisiológicos de registro intracelular comentado en el apartado anterior.

Tabla M. 2. Materiales y soluciones utilizadas en los procedimientos electromiográficos.

Materiales y soluciones químicas utilizadas
<p><b>Tribromoethanol (TBE) 2%</b> (2 g de 2, 2, 2-Tribromoethanol por cada 100 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada): solución anestésica para el ratón (0,15 ml de TBE por cada 10 g de peso del animal).</p> <p><b>Utillaje para la preparación del músculo a registrar:</b> Instrumental de microcirugía para el corte de la piel (pinzas, tijeras) material de sutura para suturar la zona posteriormente a la grabación.</p> <p><b>Electrodo de aguja monopolar</b> (Natus Manufacturing Limited): Alambre sólido de acero inoxidable, de unos 0,4 mm de diámetro, recubierto con material aislante excepto su punta.</p> <p><b>Electrodo de referencia:</b> Aguja hipodérmica de acero inoxidable, sin aislamiento alrededor.</p> <p><b>Equipo completo de electromiografía</b> (Medelec Mystro plus, GR20; Teca Medelec, London, UK).</p> <p><b>Contador de frecuencia:</b> Este aparato móvil funciona contando el número de oscilaciones en las ondas aéreas durante un período de tiempo determinado, dando la frecuencia de estas oscilaciones, y, por lo tanto, la frecuencia de transmisión.</p>

### **3.7.6.- Artefactos más comunes en la electrofisiología.**

Con la obtención de los registros electromiográficos y electrofisiológicos se pueden extraer resultados de interés y determinar la influencia del estrés en estos parámetros estudiados. No obstante, es importante tener en cuenta que esta señal se va a obtener seguramente mezclada con información sobrante que no solamente puede entorpecer la tarea realizada, sino que puede llegar a plantearnos resultados erróneos, y por lo tanto hay que considerarlos (Hägg, 1985). Para poder eliminarlos adecuadamente y evitar estos sesgos, es importante saber identificarlos. El ruido o interferencia que puede afectar tanto a las señales EFG como EMG captadas, está compuesto por estos distintos orígenes.

#### **3.7.6.1.- Artefactos debidos a los dispositivos electrónicos.**

Cualquier tipo de aparato o sistema digital genera un ruido eléctrico. Este tipo de ruido presenta componentes de frecuencia muy variables, y aunque puede ser eliminado en muchas ocasiones a partir del propio instrumental informático, el proceso de utilización de estas técnicas se realiza en zonas aisladas y en las que podamos minimizar este cruce de información. De hecho, como hemos comentado anteriormente, rodeando la distribución del sistema de electrofisiología existe una caja de Faraday, trascendental para un buen bloqueo de las señales electromagnéticas externas que no nos interesen para el experimento.

#### **3.7.6.2.- Artefactos de movimiento.**

Este tipo de interferencia puede ser generada por el movimiento de los cables que se encargan de conectar los electrodos al amplificador o a la tabla digitalizadora. También existe otro tipo, más específico, relacionado con la diferencia de potencial entre las distintas capas de los tejidos, especialmente en los registros electromiográficos se puede encontrar más de una superficie durante la penetración del electrodo. Este tipo de artefacto, debido a la inserción de la aguja, es conocido como ruido o potenciales de inserción. En este caso la solución es más sencilla, simplemente con el movimiento de la aguja para su recolocación, se esperan unos segundos para ver si la respuesta eléctrica sigue (lo que sería indicativo de ruido de placa), o por lo contrario desaparece (lo que supondría ruido de inserción). En nuestro caso, es importante que en los estudios "in vivo" se controle constantemente la anestesia del animal, ya que una ligera contracción activa también supondría una alteración de los resultados.

### **3.7.6.3.- *Ruido electromagnético.***

El tejido, y el cuerpo en general, presentan un comportamiento similar al de una antena; la superficie corporal es capaz de absorber tanto emisión eléctrica como magnética con facilidad. Esto puede significar fácilmente una superposición en la señal captada, o directamente, una cancelación del estímulo registrado. Evitar la exposición a este ruido, tanto por parte del animal de experimentación como del experimentador, resulta imposible, y aunque gran parte del procesamiento posterior, y la aplicación de filtros puede minimizar su efecto, en los estudios electromiográficos es muy útil usar además un electrodo de tierra, que permite disminuir los diferentes artefactos eléctricos que puedan producirse.

### **3.7.6.4.- *Señal cruzada (“cross-talk signal”).***

Es necesario considerar que alguna parte de la señal captada puede proceder de otros músculos adyacentes al área de estudio. Esta actividad añadida se puede superponer a la señal EMG e interferir con el registro. Este tipo de interferencia se puede reducir eligiendo el tamaño de los electrodos, como también aumentando el control de su inserción y movimiento durante el registro.

## **3.8.- TÉCNICA PAS-ALCIÁN.**

Conocer la formación y la ubicación de los PGM es de gran ayuda para entender su desarrollo y funcionalidad. La identificación de estos puntos desencadenantes, idénticos a los que se pueden encontrar en tejido humano, y situados alrededor de las placas motoras disfuncionales del animal, se puede conseguir mediante la observación histológica de características musculares distintas, y cambios en las sustancias bioquímicas presentes.

Para la correcta realización de la tinción del músculo se usó un protocolo adaptado y combinado de una variante de la conocida técnica del Ácido Periódico de Schiff (PAS; ver Tabla M.3), uno de los métodos químicos más utilizados en histología para identificar glicosaminoglicanos o glucidos tisulares, sumado a la tinción azul Alcían (2,5 pH; ver Tabla M.3). Para la tinción de PAS, el músculo se trata con ácido periódico, y durante este proceso, que los 1,2-glicoles son oxidados a grupos aldehído. Los aldehidos del reactivo de Schiff producen un color rojo/rosado, con lo que se concluye con una reacción de color específico con el marcaje de mucopolisacáridos neutros, entre otras sustancias. Además, si se combina la tinción de PAS con la de



azul alcían a un pH de 2,5, nos permite la identificación adicional de glicosaminoglicanos ácidos (GAGs). El primer paso será la disección del LAL y se deposita en una placa de Petri recubierta de Sylgard®, sumergida en solución Ringer oxigenada para mantener el músculo vivo previamente a la tinción. Es conveniente disecar al máximo las inserciones musculares, dejando únicamente lo mínimo para poder estirar el LAL adecuadamente, ya que estas absorben también parte de los colorantes. A partir de este momento se procede a aplicar la tinción.

Se sumerge el músculo en azul Alcían (2,5 pH) durante 15 minutos; se lava con agua corriente durante unos 3 minutos para eliminar excesos y se realizan 2 cambios posteriores de H<sub>2</sub>O bidestilada de 1,5 minutos cada uno de ellos; se introduce la muestra en ácido periódico (solución al 0,5%; ver Tabla M.3) durante 1,5 minutos; se lava con H<sub>2</sub>O bidestilada durante 1,5 minutos; reactivo de Schiff durante 7,5 minutos; se lava con 2 cambios de H<sub>2</sub>O bidestilada, de 1,5 minutos cada uno; 3 cambios con metabisulfito de sodio (solución al 10%; ver Tabla M.3), cada una de 30 segundos; y lavado con agua corriente durante 2,5 minutos.

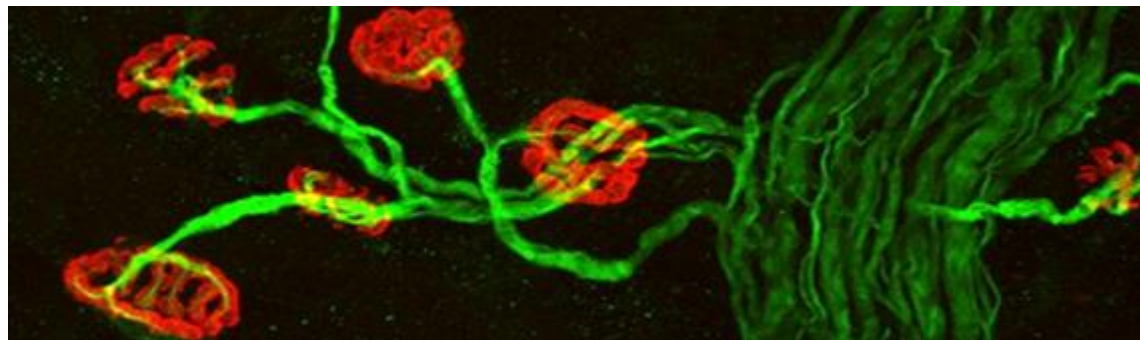
Una vez teñido el músculo, se eliminan las inserciones y se coloca la muestra en un portaobjetos fijándola de forma temporal con glicerina para una primera visualización en el microscopio y, si se encuentra teñida correctamente, para conservarla será necesario lavarla de nuevo con 3 cambios de H<sub>2</sub>O bidestilada de 5 minutos cada uno y se deshidratará, con una progresión de alcoholes de concentraciones crecientes durante 10 minutos cada una) y, finalmente con 3 cambios de xilol de 10 minutos. Finalmente, las muestras son montadas con la resina epóxida DPX. Este procedimiento permitirá frenar la autólisis producida por las enzimas de las propias células musculares, la putrefacción causada por microorganismos adyacentes y la descomposición final de nuestra muestra. Estas muestras, después de un tiempo prudencial de reposo, podrán ser visualizadas con la ayuda de un microscopio *laser scanning confocal Nikon (TE 2000-E)*. Aumento inicial 200X.

Esta tinción se observa con cierta coloración rosada, indicativa de la existencia de GAGs neutros, combinada con una coloración azulada, que marca la presencia de GAGs ácidos. En el caso de que la imagen presente nodos de contracción, estos se visualizaran como pequeños nódulos, con un parecido razonable al de un racimo de uva, y que a mayor magnificación deben de presentar un engrosamiento de la fibra muscular, con sus sarcómeros contracturados.

**Tabla M. 3. Materiales y soluciones utilizadas durante la aplicación de las técnicas morfológicas.**

<b>Materiales y soluciones químicas utilizadas</b>
<p><b>Tribromoethanol 2%</b> (2 g de 2, 2, 2-Tribromoethanol por cada 100 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada): solución anestésica para el ratón (0,15 ml de TBE por cada 10 g de peso del animal).</p> <p><b>Utillaje para la disección del LAL:</b> Lupa binocular estereoscópica, matraz aforado de 100 ml, instrumentación microquirúrgica (pinzas, tijeras, etc), vaso de precipitados, placa de Petri recubierta de Sylgard®, pipetas, pipetas Pasteur de un solo uso, agujas entomológicas, portaobjetos y cubreobjetos.</p> <p><b>Temporizador electrónico:</b> Necesario para el control de los tiempos establecidos durante la aplicación de la técnica, y durante los procesos de deshidratación de la muestra.</p> <p><b>Técnica del PAS-Alcián (2,5 Ph)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Ácido Periódico (0,5%): 0,5 g de ácido periódico en 100 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.</li><li>- Azul Alcián (pH 2,5): 1 g de Alcian Blue, 8GX disuelto en una solución de ácido acético al 3% (3 ml de ácido acético glacial, a enrasar todo mediante 97 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 100 ml). Importante que, con el objetivo de evitar precipitados que puedan dañar la muestra, será necesario utilizar un agitador para homogeneizar la solución por completo.</li><li>- Reactivo de Schiff, para la detección de aldehídos en la muestra (100 ml)</li><li>- Metabisulfito de Sodio (solución 10%): 1 g de metabisulfito de sodio en 100ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.</li></ul> <p><b>Glicerina (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>):</b> necesario para el montaje provisional de la muestra.</p> <p><b>Deshidratación de la muestra:</b> H<sub>2</sub>O bidestilada, para limpiar las impurezas y excesos de la tinción; alcohol de graduación progresiva (30%, 50%, 70%, 100%); xilol (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).</p> <p><b>DPX:</b> para el montaje definitivo de la muestra.</p> <p><b>Microscopio laser <i>scanning confocal Nikon (TE 2000-E)</i>:</b> Para la visualización de la muestra (Aumento inicial 200X).</p>

## 4.- RESULTADOS





#### **4.1.- ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN.**

Esta forma de estrés consistió en introducir a los ratones en jaulas de inmovilización homologadas para esta finalidad, durante 1 hora, y se evaluaron los distintos cambios histológicos, electrofisiológicos y electromiográficos post-tratamiento.

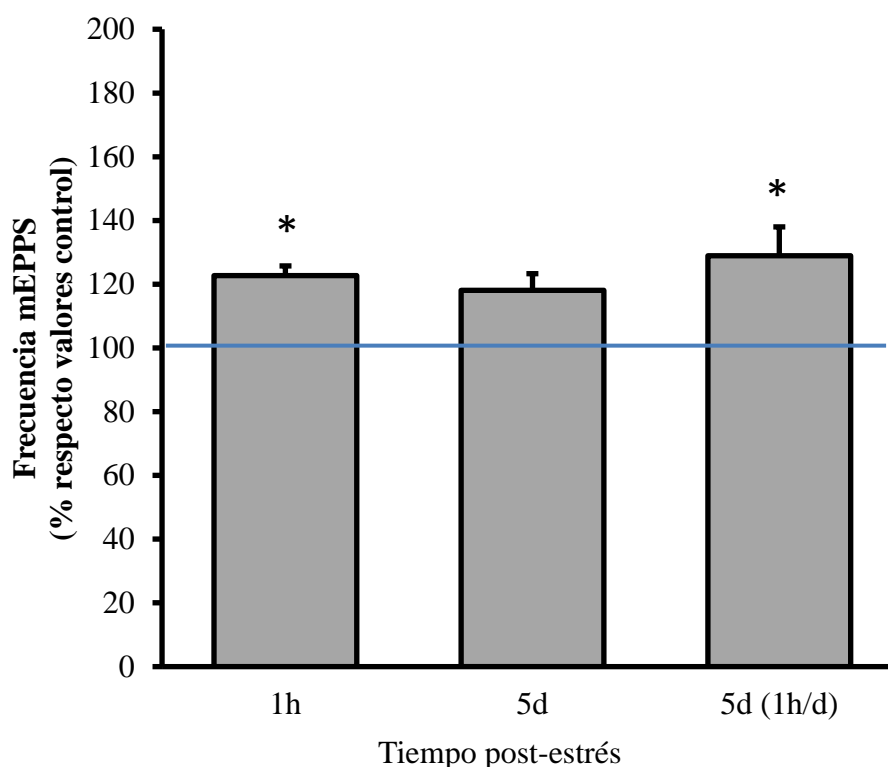
##### **4.1.1.- Electrofisiología de registro intracelular.**

Con el propósito de determinar cambios neuromusculares a nivel unicelular, después de la aplicación del estrés, se procedió a la extracción del músculo LAL y evaluar los parámetros de frecuencia de aparición y amplitud de los mEPPs.

Como se puede ver en la Figura R.1, en los registros posteriores a la aplicación de 1h de inmovilización, la frecuencia de aparición aumentó alrededor de un 25% (% de variación respecto a control:  $122,74 \pm 3,00$ ; N=80 registros; P=0,027) respecto a los valores control, y presentó una tendencia a la normalización a los 5 días post-tratamiento (% de variación respecto a control:  $118,1 \pm 5,2$ ; N=53 registros; P=0,142). Curiosamente, estos valores se mantuvieron cuando hubo el mismo tratamiento aplicado de forma consecutiva durante 5 días, respondiendo prácticamente de la misma forma que una única intervención (% de variación respecto a control:  $128,94 \pm 9,05$ ; N=64 registros; P=0,045).

La amplitud promedio de los mEPPs no presentó diferencias significativas respecto al control en ninguno de los períodos post-tratamiento (máxima % de variación 10%) indicando pues que no se produce afectación postsináptica durante la aplicación del estrés (datos no mostrados en las figuras). Con la determinación del potencial de membrana tampoco se detectaron cambios significativos (máximo % de variación registrado fue de 13,719%).

En resumen, existe un incremento en la frecuencia de los mEPPs debido a la aplicación de la inmovilización de muy bajo nivel que se mantiene por lo menos 5 días. Estos resultados evidencian que un factor estresante agudo no es suficiente para que, al menos, los cambios electrofisiológicos compatibles con un posible SDM se mantengan el tiempo suficiente. Por lo tanto, para poder confirmar esta afirmación, se estudió el efecto de otros factores estresantes agudos, y así poder comprobar si se mantenía el mismo patrón por parte del animal.



**Figura R. 1. Estrés por inmovilización. Registro intracelular.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó 1 hora, y 5 días después del tratamiento de estrés o, al quinto día, después de un estrés por reducción de movilidad de 1 hora durante días consecutivos (5 días). Los valores por encima de 100 indican el incremento producido. \*P < 0.05, n=3 animales para cada serie experimental.

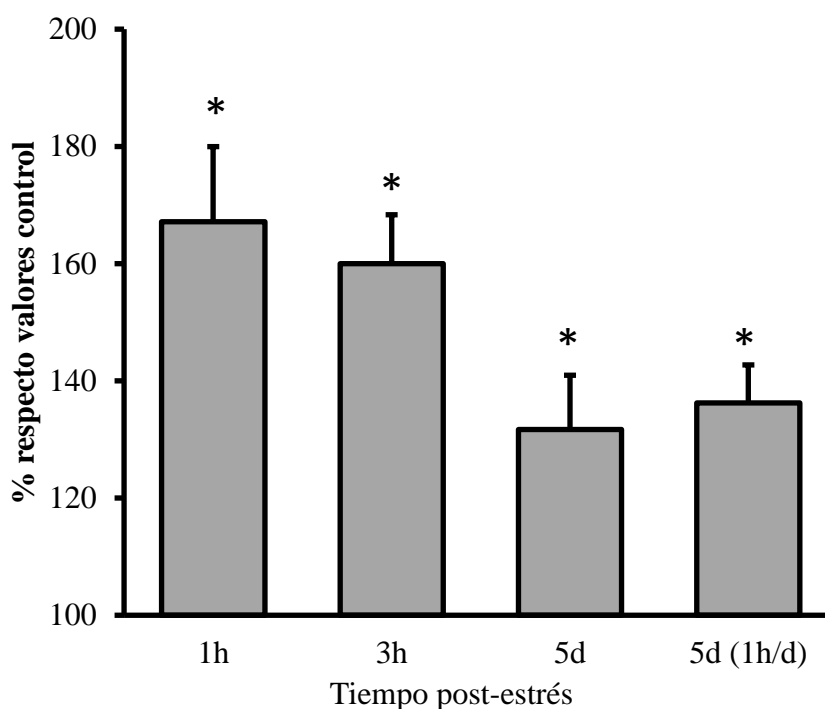
#### 4.1.2.- Electromiografía.

Con la intención de validar los datos obtenidos con el registro intracelular mediante el uso de otra técnica electrofisiológica, se procedió a determinar el número de áreas con ruido de placa terminal y su frecuencia de aparición de eventos mediante electromiografía de aguja.

Inicialmente, en un primer grupo experimental, y con el animal bajo anestesia, se realizó una primera electromiografía control del paquete muscular posterior izquierdo. Posteriormente, una vez el animal totalmente recuperado y despierto, se introdujo en la cámara de inmovilización, manteniéndolo inmovilizado durante 1 hora. Seguidamente, se procedió a realizar el registro experimental del paquete posterior de la pata derecha, 1 hora, 3 horas y 5 días posteriores a la inmovilización. En la Figura R.2 se puede ver que el número de áreas aumenta un 60% significativamente durante la primera hora posterior a la aplicación del estrés (% de variación respecto a control:

167,14  $\pm$  12,82; N=3 animales, n = 36 registros; P<0,05), que se mantiene prácticamente durante las primeras 3 horas (% de variación respecto a control: 160  $\pm$  8,33; N=3 animales, n= 36 registros; P<0,05) para, paulatinamente ir disminuyendo hasta llegar a los 5 días (% de variación respecto a control: 131,67  $\pm$  9,28; N=3 animales, n = 36 registros; P<0,05), aunque aún significativo respecto a los valores control.

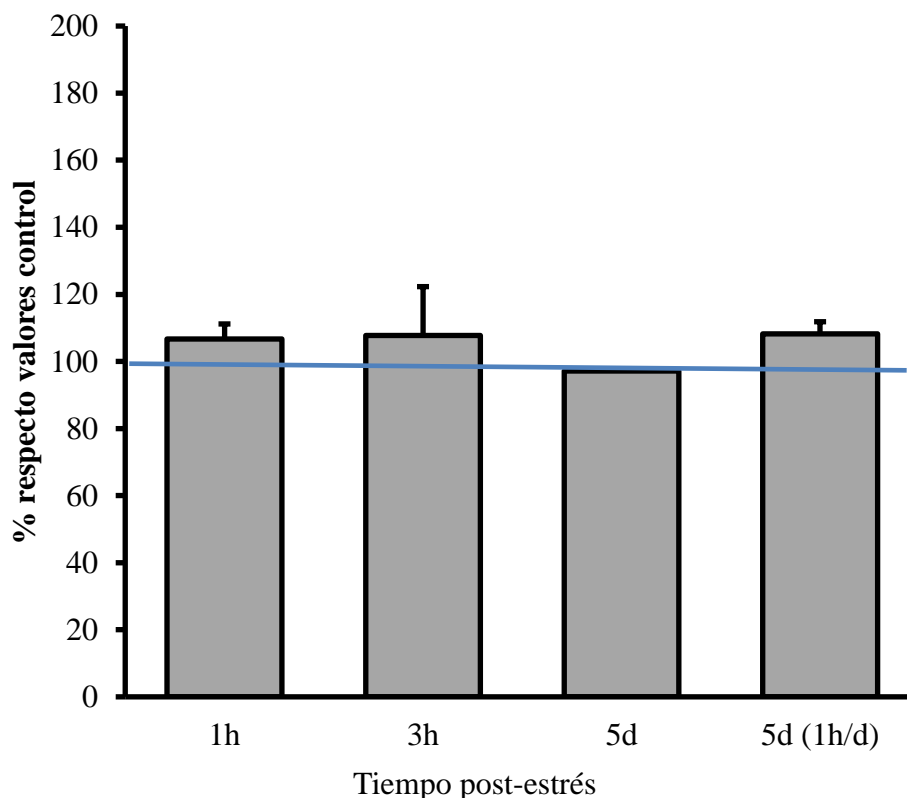
Con la intención de aumentar la duración y potencia de estos resultados, se realizó un cuarto grupo experimental en que se sometió a cada ratón a 1 hora diaria de inmovilización durante 5 días consecutivos. Como se puede ver en la Figura R.2, se obtuvo un incremento prácticamente idéntico (% de variación respecto a control: 136,25  $\pm$  6,46; N=3 animales, n = 36 registros; P<0,05) del número de áreas al que se observó 5 días después de la inmovilización.



**Figura R. 2. Estrés por inmovilización. Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó 1 hora, 3 horas y 5 días después del tratamiento de estrés o, al quinto día, después de un estrés por reducción de movilidad de 1 hora durante días consecutivos (5 días). Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \*P<0.05, n=3 animales para cada tiempo post-tratamiento.

Por otro lado, cuando se evaluó la frecuencia de aparición de eventos (Figura R.3) no se observó modificación en ninguno de los distintos grupos experimentales posteriormente a la inmovilización, manteniendo unos parámetros muy parecidos entre ellos a 1 hora (% de variación respecto a control: 106,71  $\pm$  4,46; N=3 animales, n = 36

registros;  $P > 0,05$ ), 3 horas (% de variación respecto a control:  $107,76 \pm 14,55$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P > 0,05$ ) y 5 días (% de variación respecto a control:  $97,17 \pm 0,37$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P > 0,05$ ) posteriores a la inmovilización, e incluso pasó lo mismo cuando se valoraron los resultados de 5 días consecutivos sometidos al factor estresante (% de variación respecto a control:  $108,19 \pm 3,64$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P > 0,05$ ).



**Figura R. 3. Estrés por inmovilización. Frecuencia de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó a 1 hora, 3 horas y 5 días después del tratamiento de estrés o, al quinto día, después de un estrés por reducción de movilidad de 1 hora durante días consecutivos (5 días). Los valores por encima de 100 indican el incremento producido.  $n=3$  animales para cada tiempo post-tratamiento.

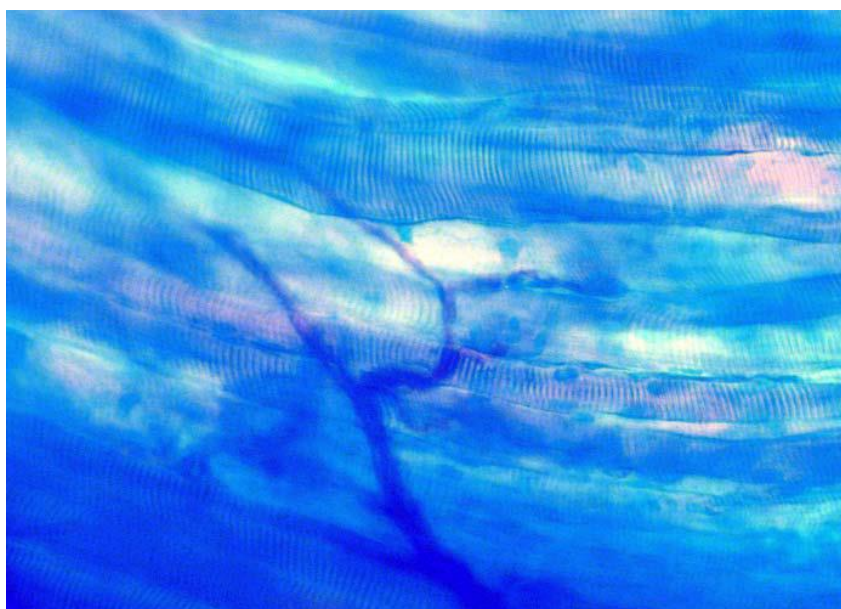
En resumen, se puede destacar un patrón muy parecido al observado durante los registros electrofisiológicos intracelulares, no obteniendo cambios en el ruido de placa lo suficientemente importantes para plantear trascendentalmente el efecto de la inmovilización como factor estresante. Además, con estos resultados obtenidos se confirma una posible situación de habituación por parte del animal, ya que los resultados finales fueron, de nuevo, redundantes.



#### 4.1.3.- Tinción PAS-ALCIÁN.

Con el objetivo de teñir los glucosaminoglicanos (GAG) e identificar posibles áreas con nodos de contracción, una vez aplicado el estrés en el animal, se procedió a extraer el músculo LAL y se realizó la técnica PAS-Alcián.

Tal como se puede observar en la Figura R.4, las fibras musculares tratadas se encuentran en buen estado, sin la presencia de nodos de contracción asociados. Esta imagen corresponde a uno de los experimentos que se realizaron 3 horas después a la aplicación de 1 hora de inmovilización. En ella no se aprecian cambios morfológicos, ni la presencia de nodos. Lo mismo sucedió con los otros tiempos estudiados, incluido cuando se estresó a los animales 1 hora diaria durante 5 días seguidos, en la que tampoco se pudo observar la presencia de nodos de contracción.



**Figura R. 4. Estrés por inmovilización. Tinción PAS-Alcián.** Imagen obtenida 3 horas post-inmovilización. No se observan nodos de contracción. Aumento inicial 200X.

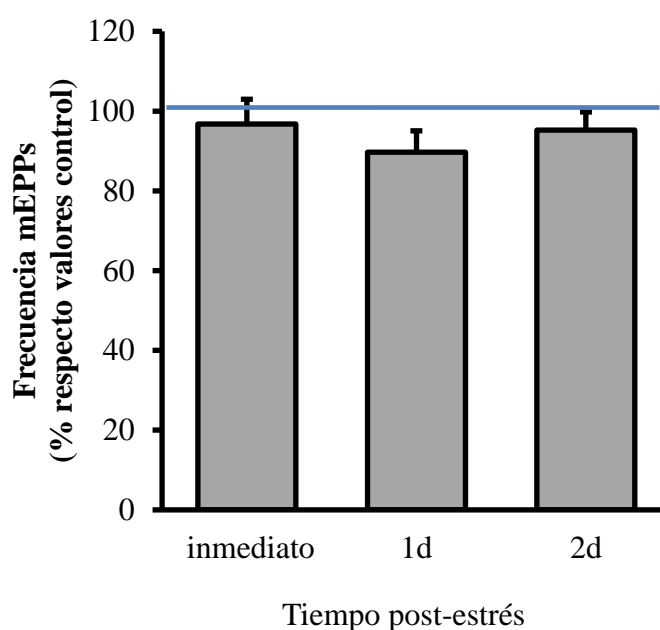
#### 4.2.- ESTRÉS POR NATACIÓN FORZADA O PRUEBA DE PORSOLT (FST, *forced swim test*).

Esta técnica se basó en introducir a los ratones en un cubículo lleno de agua a 21°C de paredes lisas durante 6 minutos, posteriormente a la habituación correspondiente, y se analizaron morfológicamente y funcionalmente los resultados de forma inmediata, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días posteriores a la aplicación del estrés.

#### 4.2.1.- Electrofisiología de registro intracelular.

##### 4.2.1.1.- FST a 37°C.

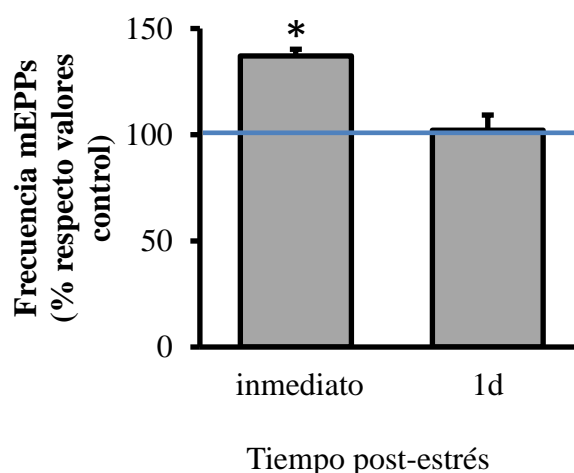
En los registros obtenidos inmediatamente después a la exposición del animal al FST con una temperatura del agua de 37°C, no se obtuvieron cambios en la frecuencia de mEPPs respecto a los valores control (% de variación:  $96,79 \pm 6,17$ ; N=62 registros; P=0,793). Se repitió el registro a las 24h (% de variación respecto a control:  $89,65 \pm 5,40$ ; N=55 registros; P=0,403) y 48h (% de variación respecto a control:  $95,20 \pm 4,58$ ; N=56 registros; P=0,684) posteriores a la aplicación del estrés, esperando una posible reacción tardía, pero se obtuvo un nulo efecto de este test a una temperatura tan alta (ver Figura R.5). Tampoco hubo cambios significativos destacables ni en la amplitud media de los mEPPs (máximo % de variación obtenido fue de 10% variación), ni en el potencial de membrana (máximo % de variación fue de 10,873%) en ninguno de los períodos post-tratamiento.



**Figura R. 5. Estrés por “Forced Swimming test” adaptado a 37°C.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después de un estrés mediante FST sin apoyo en el suelo de 6 minutos a 37°C. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPPs. n=3 animales para cada serie experimental.

#### 4.2.1.2.- *Habitación previa al FST adaptado a 21°C.*

Se procedió a la exposición del animal al FST, pero en esta ocasión, con una temperatura del agua más baja cercana a los valores del método de Molendijk y de Kloet (2019). Sin embargo, cabía la posibilidad que esa baja temperatura tuviera repercusiones indeseables sobre la musculatura del ratón y que eso alterase los resultados. Por ese motivo se procedió a realizar registros de habitación a esa nueva temperatura de 21°C. El primer paso fue introducir el ratón en el recipiente con poca agua (2-3 cms) a 37°C durante 6 minutos. Después de una recuperación de 24 horas, se realizó el mismo procedimiento, pero esta vez a 21°C durante otros 6 minutos más. Sorprendentemente, se obtuvo un aumento significativo de la frecuencia de los mEPPs inmediatamente después al cambio de temperatura (% de variación respecto a control:  $137,11 \pm 3,13$ ; N=40 registros; P=0,0019), pero a las 24 horas posteriores la frecuencia ya se encontraba normalizada (% de variación respecto a control:  $102,08 \pm 7,18$ ; N=57 registros; P=0,877). La amplitud media de los mEPPS no presentó diferencias significativas respecto a los valores control (máximo % de variación obtenido fue del 10%). El potencial de membrana tampoco presentó cambios significativos (máximo % de variación registrado fue de 8,51%).

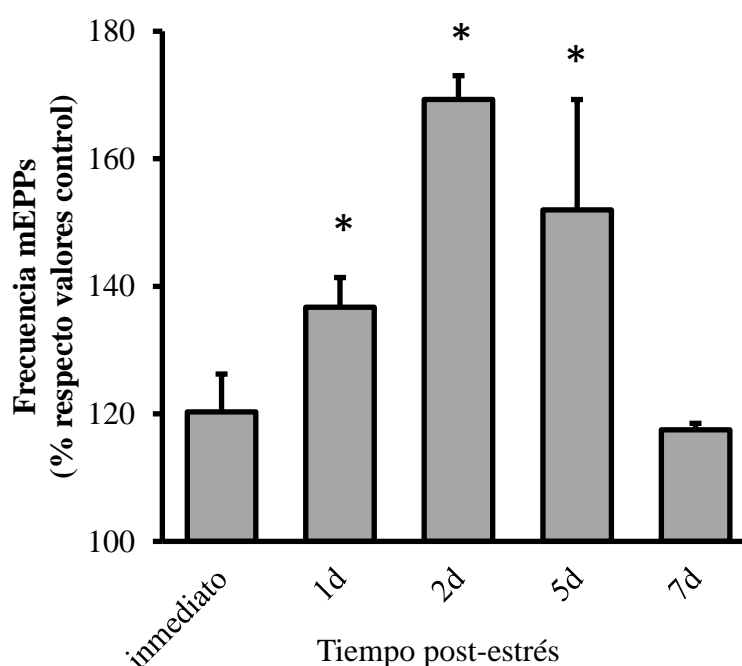


**Figura R. 6.** Habitación al "Forced Swimming test" a 21°C. Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente y 24 horas, después de una habitación consistente a 6 minutos, con apoyo en el suelo, a 37°C, y, 24 horas después, el mismo procedimiento, pero esta vez a 21°C. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPPs. \*P < 0.05, n=3 animales para cada serie experimental.

#### 4.2.1.3.- *FST a 21°C.*

Una vez establecido que la temperatura, aunque al inicio generase cambios, se normalizaba rápidamente y por lo tanto no suponía un factor añadido prolongado en el tiempo, se repitió el mismo FST que realizado a 37°C con el recipiente lleno de agua, pero ahora con la temperatura de 21°C. Los resultados muestran que no hubo

incremento significativo inmediato de los mEPPs (% de variación respecto a control:  $120,32 \pm 5,93$ ; N=55 registros; P=0,109) y solo aumentó considerablemente a las 24h (% respecto a control:  $136,76 \pm 4,65$ ; N=59 registros; P=0,0029). Como se vió en los experimentos de habituación, estos resultados indican que no ha interferido de manera relevante la temperatura de 21°C en los resultados obtenidos. A partir de las 24h, se produce un aumento gradual y progresivo de la frecuencia hasta llegar a las 48 horas, momento en el que alcanza el pico más alto (% de variación respecto a control:  $169,31 \pm 3,73$ ; N=63 registros; P<0,0001). Posteriormente se mantuvo elevado hasta 5 días posteriores a la aplicación del FST (% de variación respecto a control:  $152,00 \pm 17,30$ ; N=57 registros; P=0,0128), para ir retornando a la normalidad hasta llegar al 7º día (% de variación respecto a control:  $117,50 \pm 1,02$ ; N=55 registros; P=0,1192), en el que claramente se marca esta tendencia menguante (ver Figura R.7). En este caso, se obtuvieron disminuciones de un máximo de 20% en la amplitud media de los mEPPs a las 48h y a los 7 días en comparación con los valores control, que no fueron estadísticamente significativas. En el potencial de membrana tampoco encontramos variaciones significativas (el máximo % de variación hallado fue de 16,8%) en ninguno de los períodos post-tratamiento.



**Figura R. 7. Estrés por “Forced Swimming test” a 21°C.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas 48 horas, 5 días y 7 días, después de un estrés mediante FST sin apoyo en el suelo de 6 minutos a 21°C. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPPs. \*P < 0.05, n=3 animales para cada serie experimental.

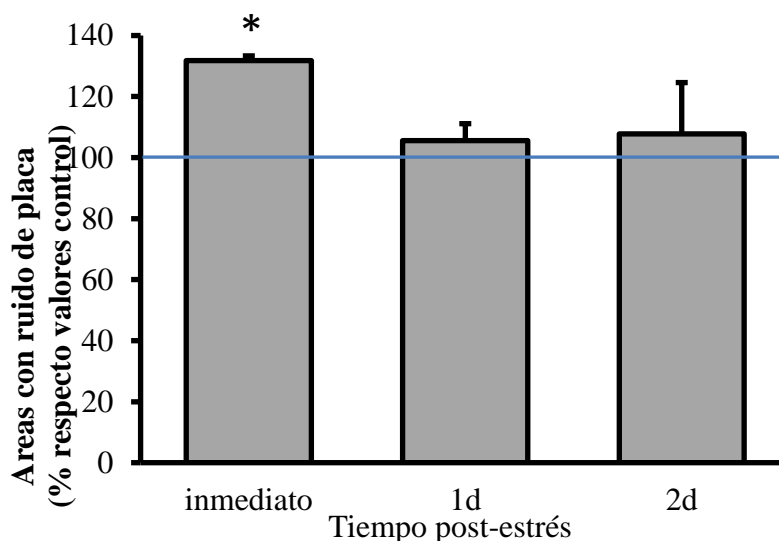
En resumen, se confirma una relación funcional existente entre los cambios en la actividad sináptica del músculo y el estrés agudo, en este caso, generado por el FST adaptado a 21°C, sin una influencia directa de la temperatura en el proceso, pero estos cambios, de la misma forma que sucedía con el estrés por inmovilización, no son suficientemente drásticos para ser determinantes en la cronificación y/o mantenimiento del SDM. El siguiente paso, pues es seguir estudiando factores estresantes agudos que cumplan con un patrón parecido al establecido hasta el momento, para poder preparar una estrategia de estrés crónico.

#### **4.2.2.- Electromiografía.**

##### **4.2.2.1.- FST a 37°C.**

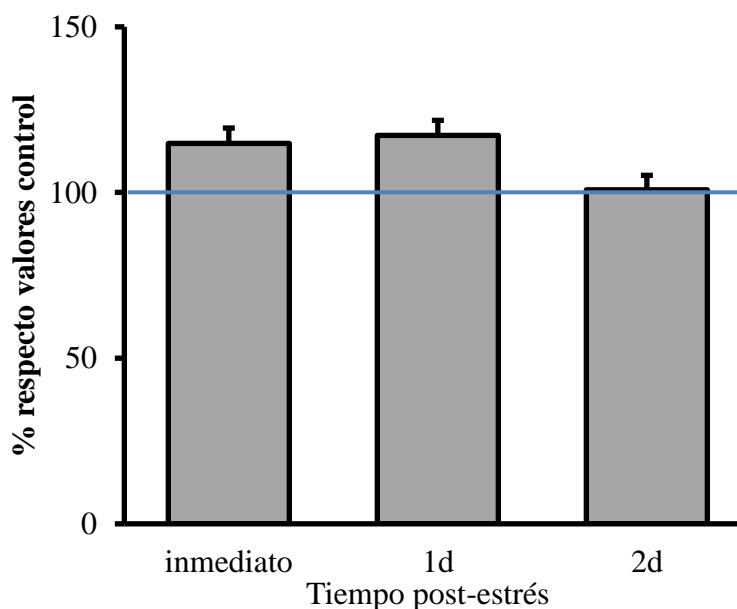
Una vez despierto el animal de la electromiografía control realizada sobre el paquete posterior de la pierna izquierda, se realizó la primera adaptación del FST a 37°C, durante 6 minutos nadando (sin apoyo en el suelo). Posteriormente se procedió al registro del tríceps sural derecho, inmediatamente, 24 horas y 48 horas posteriores. En los primeros registros obtenidos inmediatamente después a la exposición del animal a la natación forzada a 37°C, se obtuvo un discreto, pero significativo, incremento en el número de áreas con ruido de placa respecto a los valores control (% de variación respecto a control:  $131,74 \pm 1,58$ ; N=3 ratones, n = 36 registros; P=0,0128) (ver Figura R.8). Pero estos datos disminuyeron rápidamente, y en el siguiente registro a las 24 horas, ya se habían normalizado (% de variación respecto a control:  $105,55 \pm 5,55$ ; N=3 ratones, n = 36 registros; P=0,506), y a las 48 horas seguía con unos valores muy parecidos a los del control (% de variación respecto a control:  $107,77 \pm 16,81$ ; N=3 ratones, n = 36 registros; P=0,734).

Respecto a la frecuencia (Figura R.9), no se observaron cambios significativos inmediatamente (% de variación respecto a control:  $114,87 \pm 4,59$ ; N=3 ratones, n = 36 registros; P=0,185), y a las 24 horas se mantuvo prácticamente igual (% de variación respecto a control:  $117,19 \pm 4,59$ ; N=3 ratones, n = 36 registros; P=0,061), igual que a las 48 horas, período en el que la normalización fue completa (% de variación respecto a control:  $100,78 \pm 4,4$ ; N=3 ratones, n = 36 registros; P=0,964).



**Figura R. 8. Estrés por “Forced Swimming test” a 37°C: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después de un estrés mediante FST sin apoyo en el suelo durante 6 minutos a 37°C. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \* $P < 0.05$ ,  $n=3$  animales para cada grupo experimental.

De este apartado pues se puede resolver que los resultados se encuentran perfectamente acordes a los obtenidos durante el estudio electrofisiológico intracelular de este mismo método experimental.

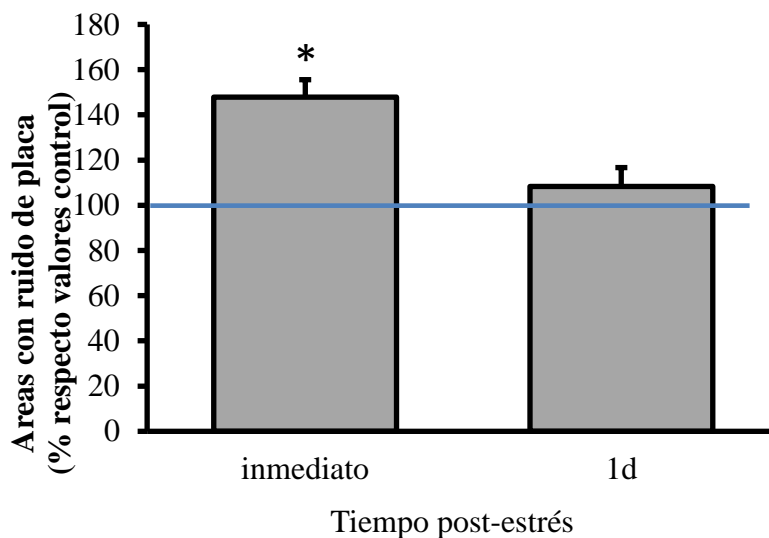


**Figura R. 9. Estrés por “Forced Swimming test” a 37°C: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después de un estrés mediante FST sin apoyo en el suelo de 6 minutos a 37°C.  $n=3$  animales para cada grupo experimental.

#### 4.2.2.2.- *Habitación previa al FST a 21°C.*

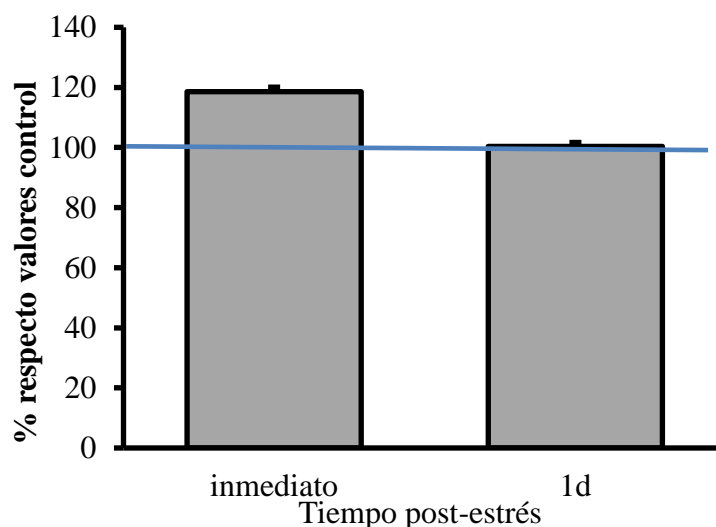
A la vista de los exiguos resultados de los experimentos a 37°C se pensó que la temperatura del agua había de ser menor. El diseño del experimento tiene que ser suficiente para poder descartar la acción directa del frío sobre la musculatura y así asegurar que los resultados que se obtengan sean exclusivamente atribuibles al estrés. Así que el primer tipo de experimentos que se realizó fue el de habitación a 21°C con la cantidad mínima de agua para que los animales no precisaran nadar durante 6 minutos.

Inmediatamente al terminar la intervención se observó un aumento de la cantidad de áreas activas (% de variación respecto a control:  $147,77 \pm 7,77$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,004). De todas formas, como sucedió con los registros intracelulares, los valores regresaron a control 24 horas después del proceso de habitación (% de variación respecto a control:  $108,33 \pm 8,33$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,734) (Figura R.10).



**Figura R. 10. Estrés por habitación al “Forced Swimming test” adaptado a 21°C: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas se evaluó inmediatamente y 24 horas, después de una habitación consistente a 6 minutos, con apoyo en el suelo, a 37°C, y, 24 horas después, el mismo procedimiento, pero a 21°C. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \*P < 0.05, n=3 animales para cada grupo experimental.

Respecto a la frecuencia de aparición de eventos ninguno de los experimentos realizados provocó ningún cambio significativo (ver figura R.11). Inmediatamente también se produce un ligero incremento no significativo (% de variación respecto valores control:  $118,55 \pm 1,53$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,393) pero a las 24 horas vuelve completamente a los valores control (% de variación respecto a control:  $100,33 \pm 1,35$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,946).

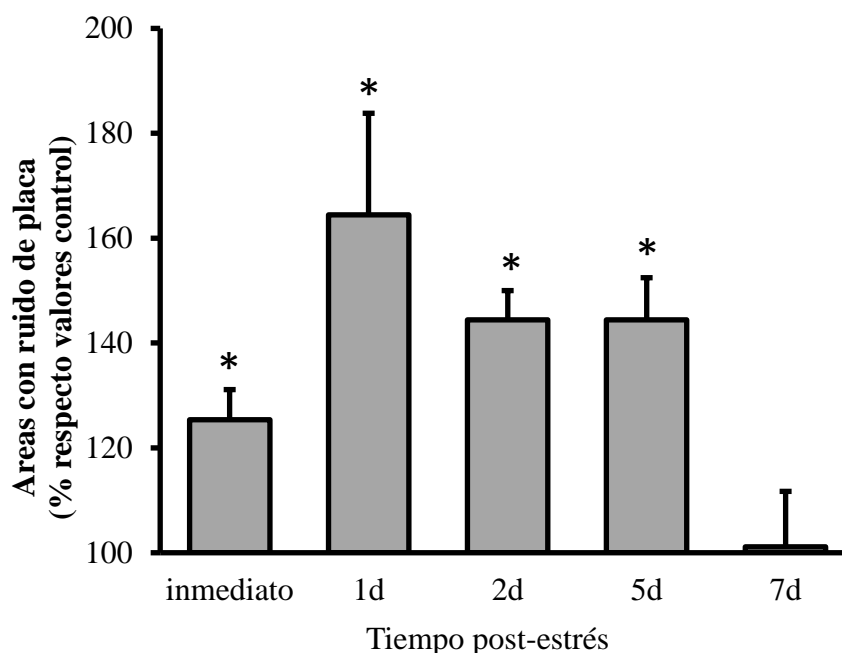


**Figura R. 11. Estrés por habituación al “Forced Swimming test” adaptado a 21°C: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente y 24 horas, después de una habituación consistente a 6 minutos, con apoyo en el suelo, a 37°C, y, 24 horas después, el mismo procedimiento, pero a 21°C. n=3 animales para cada grupo experimental.

#### **4.2.2.3.- FST adaptado a 21°C.**

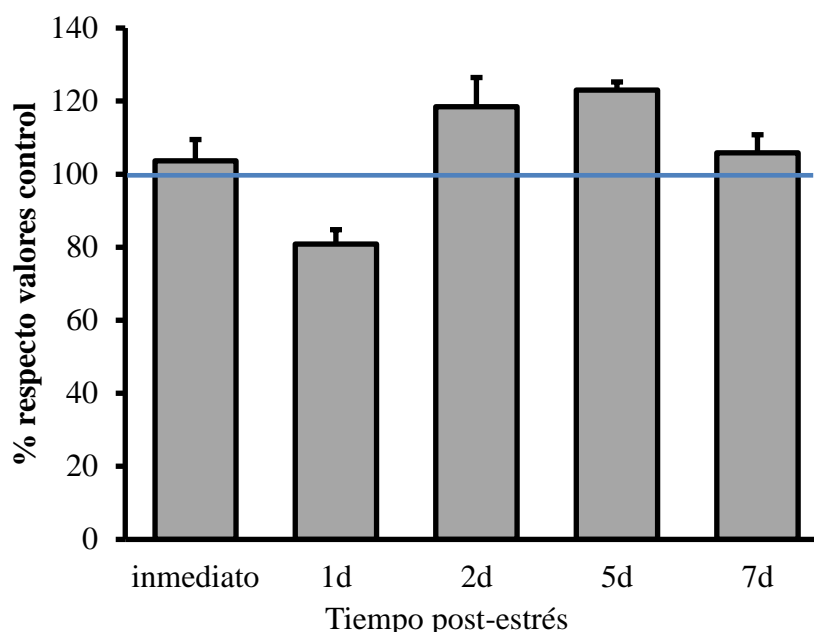
Posteriormente a un bajo y breve efecto del agua a 21°C durante el proceso de habituación, se procedió a realizar nuevamente el FST, manteniendo la temperatura a 21°C, pero en esta ocasión, con suficiente agua como para forzar la natación del roedor y así provocar estrés. Como se puede ver en la figura R.12, se observó un incremento inmediato del número de áreas activas (% de variación respecto a control:  $125,39 \pm 5,72$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0237), que tuvo su punto álgido a las 24 horas (% de variación respecto a control:  $164,44 \pm 19,37$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0364), y que a pesar de sufrir una ligera disminución a las 48 horas (% de variación respecto a control:  $144,44 \pm 5,55$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0149), se mantuvo elevado hasta 5 días después de la aplicación del estrés (% de variación respecto a control:  $143,75 \pm 8,01$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0074). A partir de aquí, la propensión de la actividad de las áreas estudiadas fue la de volver a los valores control iniciales, siguiendo un camino prácticamente idéntico al obtenido con la electrofisiología de registro intracelular (% de variación respecto a control:  $101,111 \pm 10,59$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=1).





**Figura R. 12. Estrés por “Forced Swimming test” a 21°C: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo-post tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas 48 horas, 5 días y 7 días, después de un estrés mediante FST sin apoyo en el suelo de 6 minutos a 21°C. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \*P < 0.05, n=3 animales para cada grupo experimental.

Por lo que concierne a los resultados de la frecuencia, tal como se puede ver en la Figura R.13, encontramos algunas variaciones no significativas, aunque, en términos generales, siguieron la misma dinámica que los experimentos anteriores, y se mantuvieron dentro de los márgenes de los valores control. En este caso, aunque inmediatamente no se apreció ningún cambio (% de variación respecto valores control:  $103,68 \pm 5,79$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,8527), durante las primeras 24 horas sucedió un proceso invertido, en el que los parámetros de la frecuencia incluso disminuyeron por debajo de la línea de normalidad (% de variación respecto a control:  $80,85 \pm 3,94$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0565); seguidamente se produjo un aumento no significativo, de un 20% (% de variación:  $118,48 \pm 7,97$ ; P=0,3281 a las 48 horas y % de variación:  $123,02 \pm 2,22$ ; P=0,3643 a los 5 días, respectivamente; en los dos casos: N=3 animales, n = 36 registros), que se mantuvo hasta el 7º día posterior al experimento, en el que se continuó obteniendo valores control (% de variación respecto a control:  $105,8 \pm 4,98$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,4301).

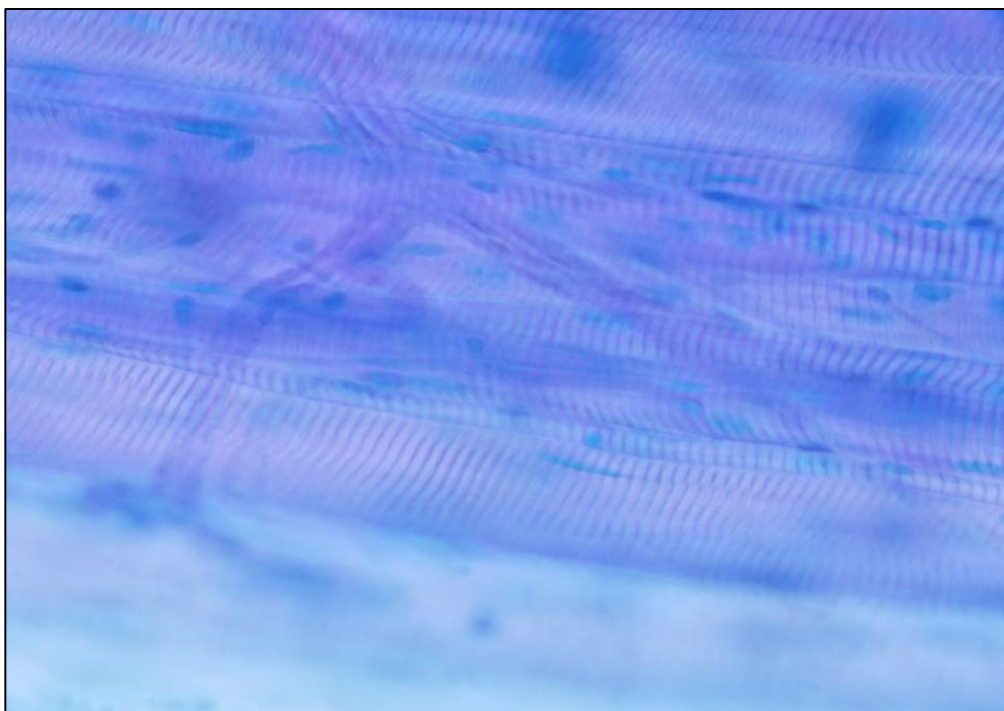


**Figura R. 13. Estrés por “Forced Swimming test” adaptado a 21°C: Frecuencia de aparición de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después de un estrés mediante FST sin apoyo en el suelo de 6 minutos a 21°C. n=3 animales para cada grupo experimental.

En definitiva, los cambios generados por el FST, de la misma forma que sucedía en los registros de electrofisiología, y siguiendo la misma línea que sucede con la inmovilización, no persisten más allá de 5 días, y en todos los casos, al 7º día ya se observan valores prácticamente control.

#### 4.2.3.- Tinción PAS-ALCIÁN.

Se realizó esta técnica en el LAL de animales a los que previamente se había aplicado el FST a una temperatura de 21°C, y con el objetivo de reducir el número de animales sacrificados, sólo en el período de tiempo post-tratamiento que presentó cambios más significativos durante el desarrollo de las pruebas electrofisiológicas, a las 48 horas posteriores a la aplicación del estrés. Aún así, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos durante el estrés por inmovilización, y las imágenes mostraban una completa integridad de las fibras musculares tratadas, sin la presencia de nodos de contracción en las zonas analizadas, ni rasgos característicos que pudieran remarcar de forma significativa la presencia de GAGs en áreas específicas del músculo, tal como podemos observar en la Figura R.14.



**Figura R. 14. Tinción PAS-Alcián. Estrés por “Forced Swimming test” adaptado a 21°C:** Imagen obtenida a las 48 horas post-tratamiento. Desafortunadamente no se observaron nodos de contracción en ninguna área del músculo (aumento inicial 200X).

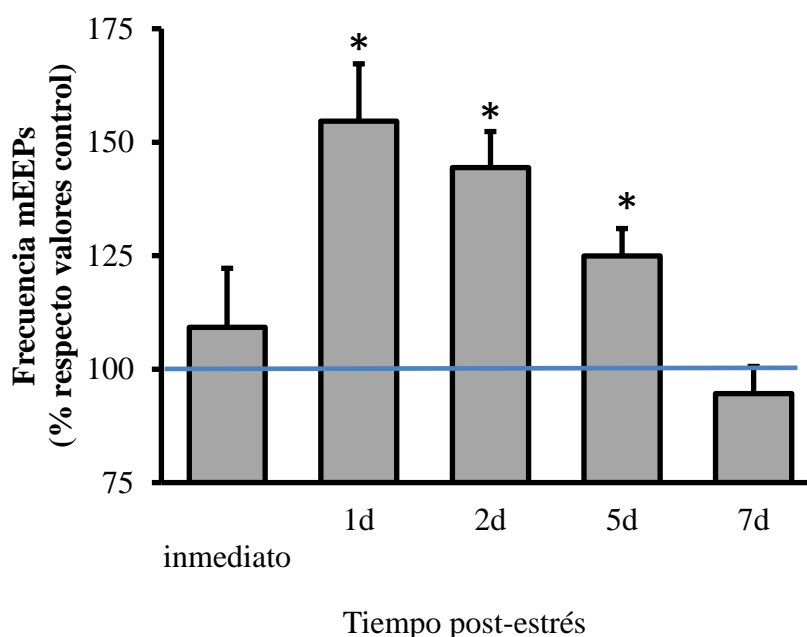
De esta manera, el próximo factor estresante a estudiar fue la privación de una necesidad tan básica como el alimento y el agua y si pueden generar, a corto plazo, un efecto más marcado que el obtenido con los estresores utilizados hasta el momento.

#### **4.3.- ESTRÉS POR PRIVACIÓN DE COMIDA Y AGUA.**

##### **4.3.1.- Electrofisiología de registro intracelular.**

Los registros se realizaron después del ayuno impuesto a los animales durante 24h. Los resultados electrofisiológicos obtenidos muestran una curva muy parecida a la obtenida con el estrés aplicado mediante el FST (ver Figura R.15). La reacción en la frecuencia de los mEPPs no fue inmediata (% de variación respecto a control:  $109,23 \pm 12,98$ ; N=67 registros; P=0,5368) si no que se desencadenó pasadas las 24 horas de la aplicación del estrés (% de variación respecto a control:  $154,67 \pm 12,6$ ; N=66 registros; P=0,0015). Al igual que sucedía en el estrés por FST, este incremento se mantuvo elevado y estable hasta las 48h (% de variación respecto a control:  $144,44 \pm 7,91$ ; N=67 registros; P=0,0014), y a partir de este momento, fue volviendo poco a poco a la normalidad (% de variación respecto a control:  $124,97 \pm 6$ ; N=59 registros;

P=0,0491, a los 5 días post-tratamiento) hasta los 7 días (% de variación respecto a control:  $94,62 \pm 5,97$ ; N=51 registros; P=0,6741), donde se muestran ya valores control. Por otro lado, la amplitud media de los mEPPs se mantuvo prácticamente idéntica en todos los experimentos al control, y solamente la encontramos más baja (% de variación máxima registrada fue de un 20%) 24 horas post-tratamiento, aunque no estadísticamente significativa. Por otro lado, el potencial de membrana tampoco presentó variaciones significativas en ninguno de los períodos post-tratamiento comparativamente con el control (% de variación máximo observado fue de 11,22%).



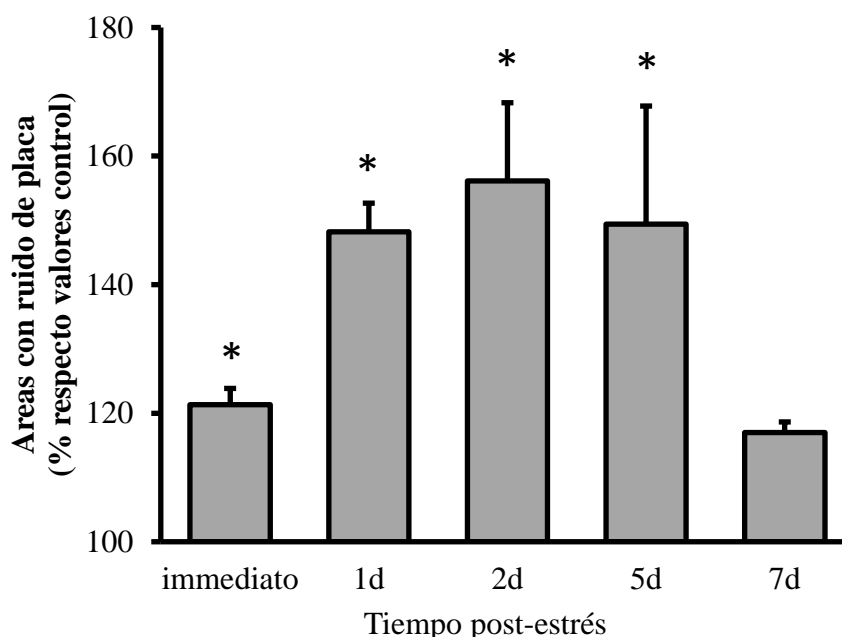
**Figura R. 15. Estrés por “Privación de comida y agua” durante 24 horas.** Porcentaje del valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPPs. \*P < 0.05, n=3 animales para cada serie experimental.

Estos resultados refuerzan la idea que un factor estresante agudo por sí solo no es suficiente para generar cambios en la neurotransmisión permanentes en el tiempo, al menos lo suficiente como para alterar el cuadro neuromuscular.

#### 4.3.2.- Electromiografía.

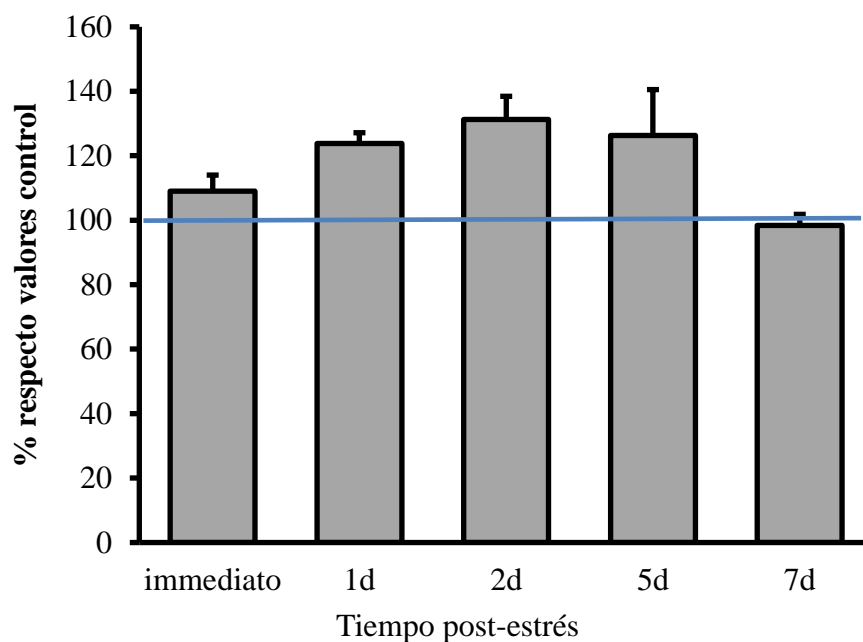
Respecto a los registros electromiográficos, en la figura R.16 se puede ver que el número de áreas con ruido de placa incrementó paulativamente desde el registro inmediato a la aplicación del estresor (% de variación respecto valores control:  $121,31 \pm 2,54$ ; N=4 animales, n = 48 registros; P=0,0248), y a las 24 horas sigue aumentando

(% de variación respecto a control:  $148,214 \pm 4,45$ ; N=4 animales, n = 48 registros; P=0,0099), hasta llegar a un máximo a las 48 horas posteriores a la aplicación del estrés (% de variación respecto a control:  $156,111 \pm 12,18$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,028); a partir de este momento, encontramos un decremento a los 5 días (% de variación respecto a control:  $149,405 \pm 18,37$ ; N=4 animales, n = 48 registros; P=0,0224) hasta que al 7º día evaluado ya se registraron valores control (% de variación respecto a control:  $116,98 \pm 1,65$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,2898).



**Figura R. 16. Estrés por privación de comida y agua durante 24 horas: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \*P< 0.05, n=3-4 animales para cada grupo experimental.

Cuando evaluamos la frecuencia de ruido de placa terminal representada en la figura R.17, se observa una dinámica similar a la obtenida con el estudio de las áreas, aunque en este caso, ningún valor tuvo cambios significativos: Inmediato, % de variación respecto a control:  $109,052 \pm 4,95$ , N= 4 animales, n = 48 registros, P=0,5331; 24 horas, % de variación:  $123,77 \pm 3,38$  N=4 animales, n = 48 registros, P=0,1271; 48 horas, % de variación:  $131,24 \pm 7,2$  N= 3 animales, n = 36 registros, P=0,3; a los 5 días, % de variación:  $126,26 \pm 14,28$ , N= 4 animales, n = 48 registros, P=0,1135; a los 7º días, % de variación respecto a control:  $98,41 \pm 3,41$ , N=3 animales, n = 36 registros, P=0,8842.



**Figura R. 17. Estrés por privación de comida y agua durante 24 horas: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. \* $P < 0.05$ ,  $n=3-4$  animales para cada grupo experimental.

De este apartado podemos concluir que se obtienen valores similares a los conseguidos con los estresores anteriores, marcando una predisposición a cambios neuromusculares similares, pero alcanzados mediante estímulos diferentes. El siguiente paso es determinar si el aislamiento social puede seguir con el mismo funcionamiento que las otras formas de estrés hasta el momento.

#### 4.3.3.- Tinción PAS-ALCIÁN.

Viendo los resultados obtenidos durante la realización de las técnicas morfológicas en los músculos de los dos factores estresantes anteriores, y valorando la posibilidad de que se repitiese el mismo resultado negativo debido a la similitud que presentaban los resultados electrofisiológicos analizados previamente, no se siguió aplicando esta tinción en los músculos obtenidos mediante factores estresantes agudos con un incremento de la frecuencia de mEPPs menor al 200%. En estudios previos de nuestro laboratorio (Margalef y cols., 2019) se obtuvieron nodos de contracción a valores superiores al 200% de incremento de la neurotransmisión espontánea. De esta forma, reduciendo aquellos experimentos con poca probabilidad de aporte científico, esta tesis se adecua al reglamento de la Directiva del Consejo de

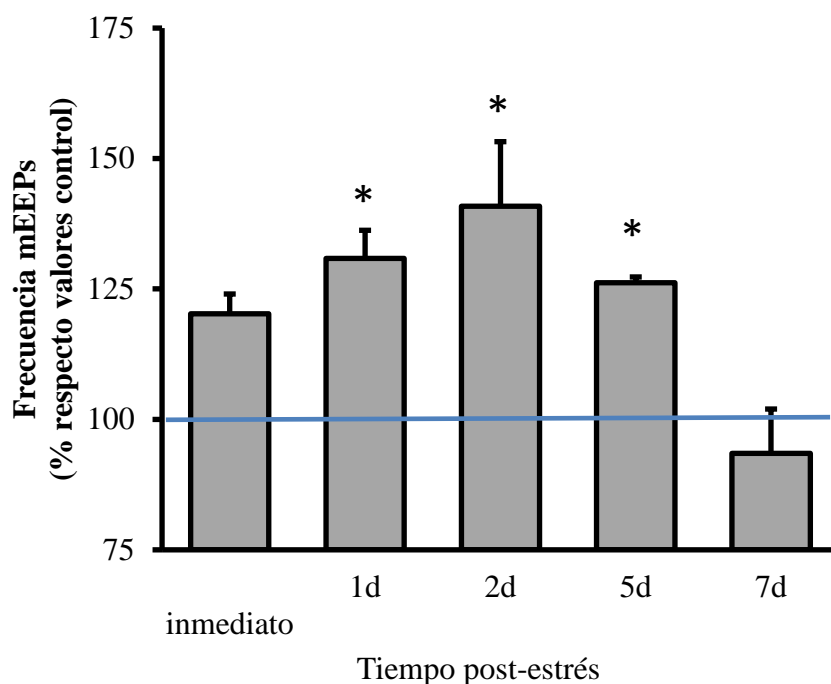
la Comunidad Europea de noviembre de 1986 (86/609/EEC) para la manipulación de animales de laboratorio, y contemplando las directrices establecidas en la ley 5/1995, del 21 de junio, de protección de los animales usados para la experimentación y por otras finalidades científicas, aprobada por el Parlamento de Catalunya.

#### **4.4.- ESTRÉS MEDIANTE AISLAMIENTO SOCIAL.**

Para el desarrollo de este factor estresante, se usó una jaula metabólica convencional de paredes lisas con 320 cm<sup>2</sup> de superficie y 14 cm de alto, mediante la cual se retuvo y se limitó la actividad metabólica y funcional del roedor durante un período de 24 horas. Los ratones, son animales sociales y este aislamiento (un único animal por jaula) los estresa.

##### **4.4.1.- Electrofisiología de registro intracelular.**

En la primera tanda de experimentos, inmediatamente después de las 24 horas en la jaula metabólica, la frecuencia de aparición de mEPPs aumentó ligeramente y de forma no significativa (% de variación respecto a control: 120,24 ± 3,80; N=59 registros; P=0,0871). A las 24 horas se obtuvo el primer aumento significativo (% de variación respecto a control: 130,86 ± 5,38; N=61 registros; P=0,0136) que siguió incrementando a las 48 horas (% de variación respecto a control: 140,85 ± 12,37; N=67 registros; P=0,0154), y se mantuvo hasta el 5º día post-tratamiento (% de variación respecto a control: 126,19 ± 1,11; N=48 registros; P=0,0218). De todas formas, a la semana de aplicar esta forma de aislamiento social, desapareció su efecto (% de variación respecto a control: 93,47 ± 8,51; N=69 registros; P=0,6393) y ya se obtuvieron valores control. Por otro lado, no se detectaron cambios en la amplitud media de los mEPPs en ninguno de los períodos estudiados (% de variación: 30%) y a los 5 días (% de variación máxima observada fue del 20%). Con la determinación del potencial de membrana tampoco se detectaron cambios significativos en ninguno de los tiempos post-tratamiento evaluados (máxima % de variación registrada fue de 5,64%).

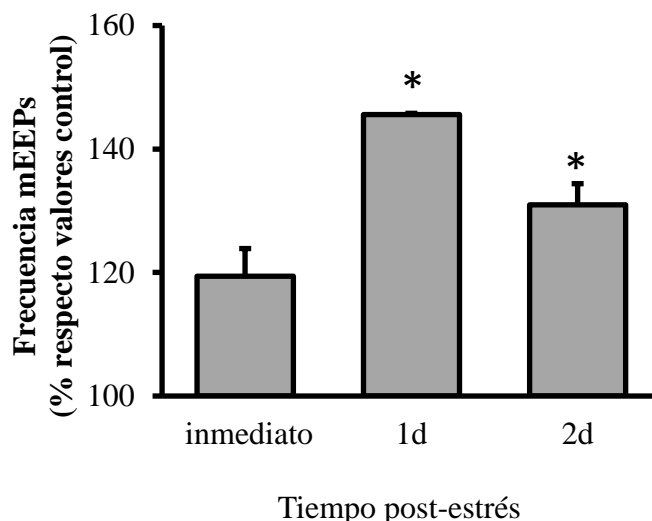


**Figura R. 18. Estrés por aislamiento mediante “jaula metabólica” durante 24 horas. Registro intracelular.** Porcentaje del valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento en el se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPs. \*P < 0.05, n=3 animales para cada serie experimental.

Con la intención de obtener un incremento de mEPs más potente, y con la idea de observar si se reproducía de nuevo el proceso de habituación adquirido mediante los estudios realizados con la aplicación de inmovilización, se diseñó un segundo set de experimentos; esta vez, se aplicó el aislamiento social de 24 horas de forma consecutiva durante 5 días seguidos. En la figura R.19 se pueden observar unos valores similares a los obtenidos mediante una única intervención; inmediatamente después de aplicar este proceso metodológico, se obtuvo un incremento (aunque no significativo) de mEPs (% de variación respecto a control:  $119,42 \pm 4,47$ ; N=45 registros; P=0,1073). El primer incremento significativo se observó a partir de las 24 horas (% de variación respecto a control:  $145,56 \pm 0,22$ ; N=38 registros; P=0,0136), y a las 48 horas, esta actividad no solamente se mantiene, sino que ya presenta una tendencia decreciente (% de variación respecto a control:  $130,96 \pm 3,43$ ; N=45 registros; P=0,0136). No se observaron cambios significativos en la amplitud media de los mEPs en ninguno de los tiempos post-tratamiento (un 20% de variación fue lo máximo registrado). Tampoco fueron significativas las variaciones detectadas en el potencial de membrana (máxima variación observada fue de 12,162%).



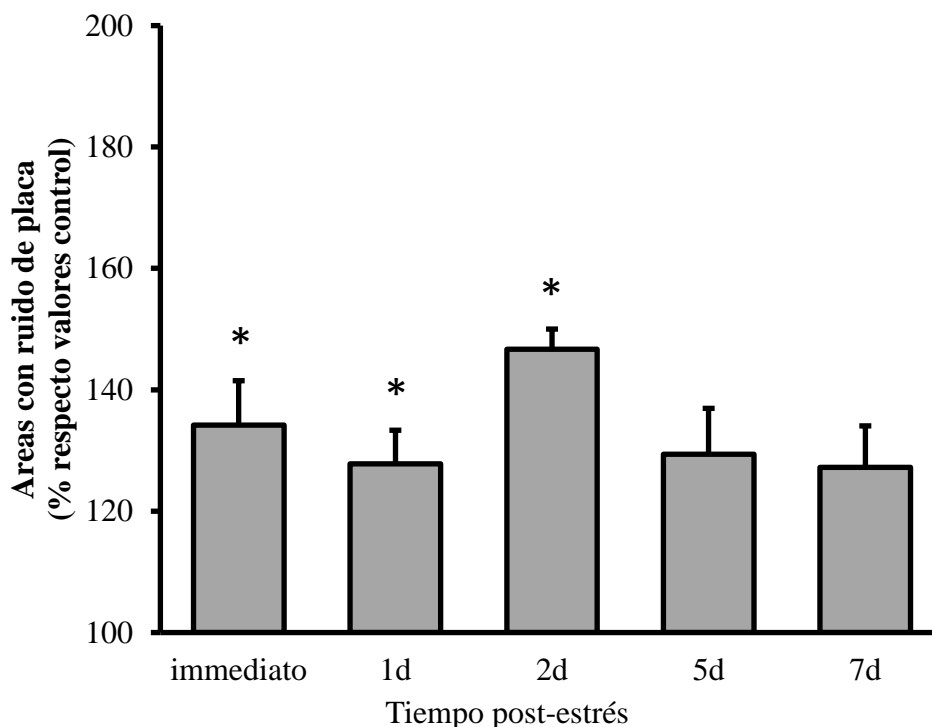
Esta situación, que no consiguió mejorar los resultados obtenidos mediante una única intervención, justificaría de nuevo una tendencia a la habituación por parte del animal.



**Figura R. 19. Estrés por aislamiento social mediante “jaula metabólica” durante 5 días consecutivos.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPPs. \* $P < 0.05$ ,  $n=3$  animales para cada serie experimental.

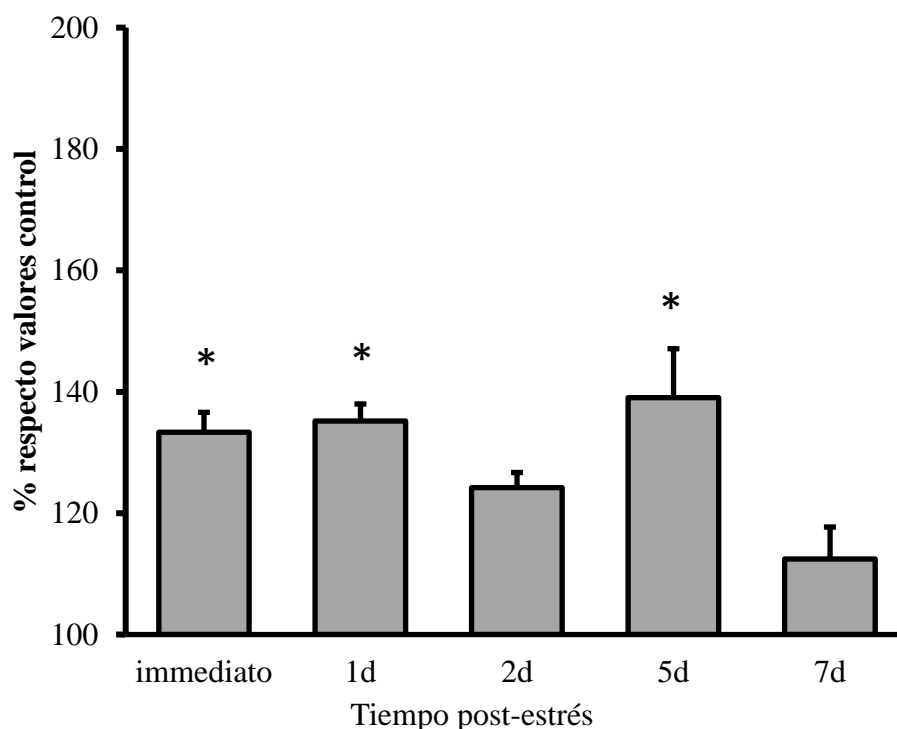
#### 4.4.2.- Electromiografía.

Este nuevo estímulo de estrés agudo generó un aumento significativo inmediato post-tratamiento del número de áreas con ruido de placa (% de variación respecto a control:  $134,19 \pm 7,29$ ;  $N=5$  animales,  $n = 60$  registros;  $P=0,0017$ ; ver Figura R.20). Este incremento se mantiene prácticamente estable durante las primeras 24 horas (% de variación respecto a control:  $127,77 \pm 5,55$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,0369$  a las 24 horas), con muy poca variación entre los experimentos y el pico no lo encontramos hasta las 48 horas posteriores a la aplicación del aislamiento (% de variación respecto a control:  $146,66 \pm 3,33$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,0406$ ). A los 5 días, mostró tendencia a la disminución (% de variación respecto a control:  $129,36 \pm 7,57$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,1671$ ) y los valores ya corresponden a valores control a los 7 días (% de variación respecto a control:  $127,22 \pm 6,82$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,2304$ ).



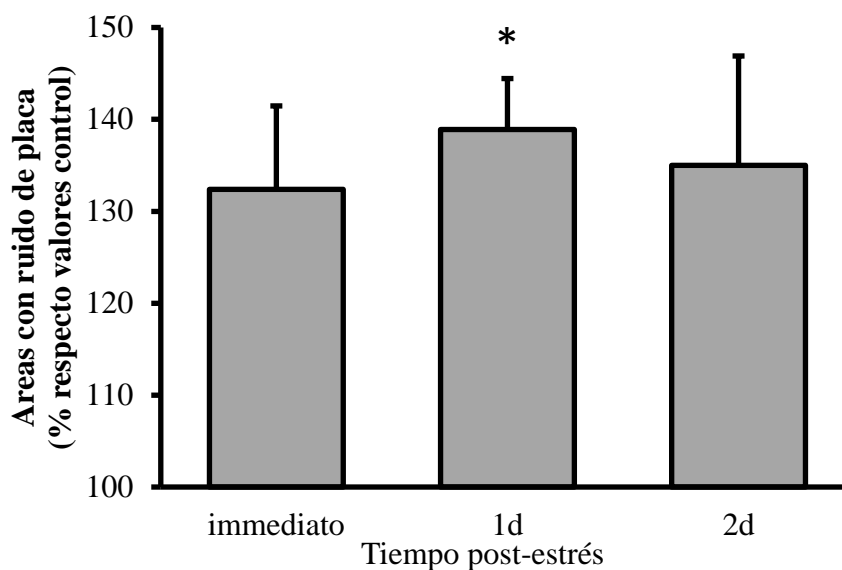
**Figura R. 20. Estrés por aislamiento social durante 24 horas: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \* $P < 0,05$ ,  $n=3-5$  animales para cada grupo experimental.

Respecto al análisis de la frecuencia de los eventos del ruido de placa, los resultados fueron menos regulares que los obtenidos con las áreas. También hubo un incremento inmediato en la frecuencia (% de variación respecto a control:  $133,33 \pm 3,27$ ;  $N=5$  animales,  $n = 60$  registros;  $P=0,0074$ ) que se alargó durante las primeras 24 horas posteriores a la aplicación del estrés (% de variación respecto a control:  $135,17 \pm 2,82$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,0039$ ), para disminuir gradualmente a las 48 horas (% de variación respecto a control:  $124,23 \pm 2,47$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,219$ ). Inesperadamente, a los 5 días post-tratamiento encontramos de nuevo una frecuencia elevada (% de variación respecto a control:  $139,02 \pm 8,06$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,0276$ , ver Figura R.21), pero manteniendo la misma tónica que en experimentos anteriores, al 7º día se había normalizado por completo (% de variación respecto a control:  $112,42 \pm 5,29$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,0579$ ).

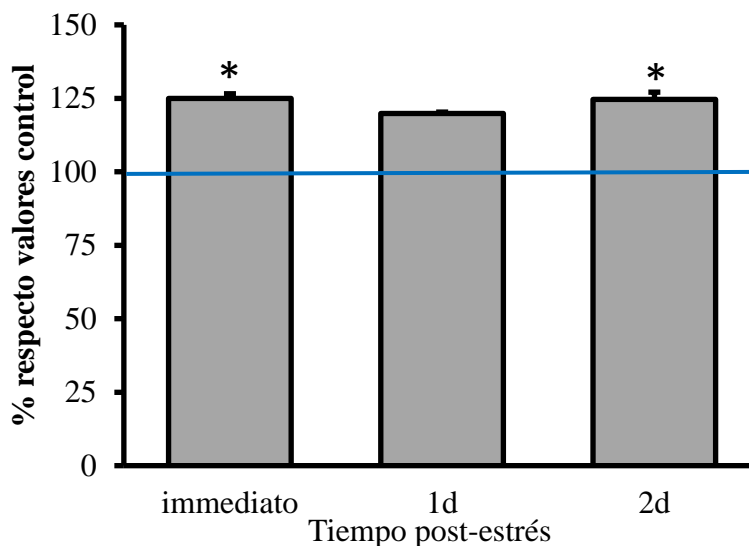


**Figura R. 21. Estrés por aislamiento social durante 24 horas: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en el número de eventos. \* $P < 0.05$ ,  $n = 3-5$  animales para cada grupo experimental.

Dado que los resultados obtenidos en los registros electromiográficos de aislamiento social durante 24 horas eran insuficientes, al igual que se hizo en el registro intracelular, se añadió un nuevo grupo experimental al que se le incrementó el tiempo de aislamiento social de 24 horas, durante un total de 5 días consecutivos (ver Figura R.22). Este método respondió siguiendo una evolución prácticamente idéntica a los resultados obtenidos mediante una única intervención. El número de áreas aumentó de forma inmediata, aunque no significativa (% de variación respecto a control:  $132,38 \pm 9,08$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,1683$ ), valores que pasaron a ser significativos a las siguientes 24 horas (% de variación respecto a control:  $138,88 \pm 5,55$ ;  $N=3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P=0,0195$ ) y rápidamente dejaron de serlo a las 48 horas y (% de variación respecto a control:  $135,00 \pm 11,90$ ;  $N=4$  animales,  $n = 48$  registros;  $P=0,1373$ ).



**Figura R. 22. Estrés por aislamiento social durante 5 días consecutivos: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \* $P < 0.05$ ,  $n=3-4$  animales para cada grupo experimental.



**Figura R. 23. Estrés por aislamiento social durante 5 días consecutivos: frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de eventos. \* $P < 0.05$ ,  $n=3-4$  animales para cada grupo experimental

Respecto a la frecuencia, al igual que sucedió con las áreas, hay un incremento moderado de un 20-25% correspondiente a cada uno de los tiempos descompuestos (inmediatamente, % de variación respecto a control:  $124,98 \pm 1,57$ ; N=3 animales, n = 36 registros, P=0,0452; 24 horas, % de variación respecto a control:  $119,9 \pm 0,42$ ; N=3 animales, n = 36 registros, P=0,2429; y 48 horas, % de variación respecto a control:  $124,65 \pm 2,45$ ; N=4 animales, n = 48 registros, P=0,0009).

En resumen, el estrés por aislamiento social sigue una dinámica similar a la obtenida con los estresores estudiados hasta el momento, resultando también insuficiente por sí solo para perpetuar cambios importantes en la actividad neuromuscular más allá de las 48 horas. Asimismo, estos últimos resultados obtenidos después de aplicar el mismo tratamiento durante 5 días seguidos confirmaron una nueva situación de habituación al estímulo por parte del roedor. En este caso no se muestra una vuelta a la normalidad en los tiempos analizados, pero tampoco se observa un incremento destacable en ninguno de los parámetros, y los cambios respecto a los valores control resultan superfluos. Por lo tanto, esto refuerza el hecho de utilizar la jaula metabólica como herramienta generadora de un estrés comparable con los otros tipos de estrés agudo utilizados.

#### **4.5.- ESTRÉS POR ULTRASONIDOS.**

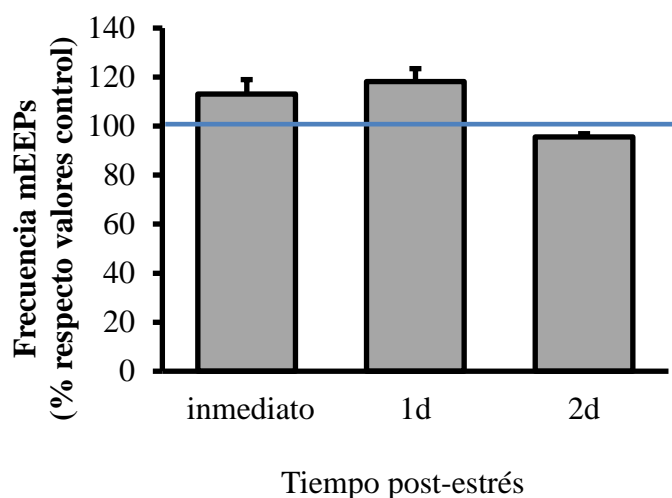
En los apartados anteriores, se aprecia claramente una proporcionalidad entre la aplicación del estrés y el aumento de la liberación de ACh, siempre a corto plazo. Por lo tanto, con la intención de evaluar otro estresor que cumpliera de forma aproximada los requisitos de los tipos de estrés estudiados hasta el momento, se procedió a utilizar ultrasonidos.

Para el desarrollo de esta metodología, se expuso a los ratones a un dispositivo ultrasónico que funcionaba a baja frecuencia (20-25 kHz) en períodos de tiempo variables e impredecibles (de entre 15 y 30 segundos) durante 3 y 24 horas y se analizaron las variaciones electrofisiológicas post-tratamiento.

##### **4.5.1.- Electrofisiología de registro intracelular.**

En los registros realizados después de 3 horas de exposición a ultrasonidos no se obtuvieron cambios en la frecuencia de mEPPs respecto a los valores control (ver

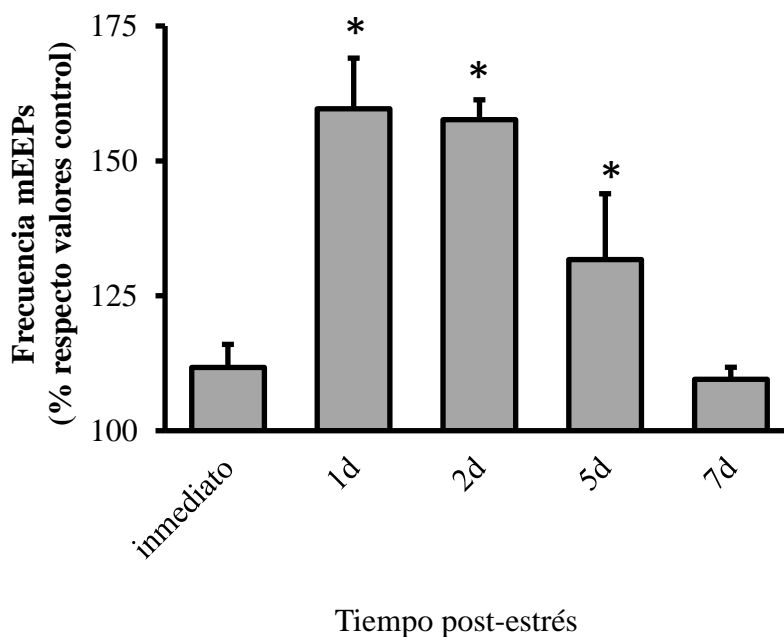
Figura R.24). Pasadas 24 horas parecía incrementar levemente, aunque en ningún momento de forma significativa (% de variación respecto a control:  $113,07 \pm 5,90$ ; N=51 registros; P=0,2973 inmediatamente post-tratamiento, y % de variación respecto a control:  $118,17 \pm 5,28$ ; N=53 registros; P=0,1418 a las 24 horas). Esperando una reacción muy tardía se realizaron registros a las 48 horas y estos parámetros seguían sin aumentar significativamente (% de variación respecto a control:  $95,62 \pm 1,28$ ; N=50 registros; P=0,6899), lo que confirmaba que el ultrasonido, aplicado durante un período de tiempo tan corto, no fué suficiente para conseguir cambios neuromusculares. Además, tampoco hubo cambios destacables ni en la amplitud media de los mEPPS (% de variación: 0,00% en todos los tiempos analizados), ni en el potencial de membrana (máximo % de variación observado fue de 10,93%) en ninguno de los períodos post-tratamiento.



**Figura R. 24. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 3 horas.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPPs. n=3 animales para cada serie experimental.

Para conseguir el efecto estresor de los ultrasonidos, se aumentó el tiempo de exposición a 24 horas, pero manteniendo las frecuencias sónicas emitidas por el dispositivo. Inmediatamente después de la exposición a ultrasonidos no se obtuvo ningún cambio (% de variación respecto a control:  $111,76 \pm 4,25$ ; N=57 registros; P=0,3276). En cambio, sí que se consiguió un incremento significativo a las 24 horas posteriores a la aplicación del tratamiento (% de variación respecto a control:  $159,66 \pm 9,39$ ; N=57 registros; P<0,0001), que se mantuvo durante las 48 horas (% de variación respecto a control:  $157,67 \pm 3,65$ ; N=59 registros; P<0,0001), para ir disminuyendo de forma paulatina a los 5 días post-exposición (% de variación respecto a control: 131,72

$\pm 12,2$ ; N=61 registros;  $P<0,0001$ ) hasta conseguir la normalización completa a los 7 días (% de variación respecto a control:  $109,56 \pm 2,21$ ; N=66 registros;  $P=0,3989$ ; ver Figura R.25). La amplitud media de los mEPPs no varió significativamente en ningún período registrado (% de variación: 20% en todos los tiempos contemplados) en comparación con los valores control. En el potencial de membrana tampoco encontramos variaciones significativas (% de variación: 4,046%, 7,215%, 1,98%, 4,45% y 8,81% respectivamente) en ninguno de los períodos post-tratamiento comparativamente con el control.

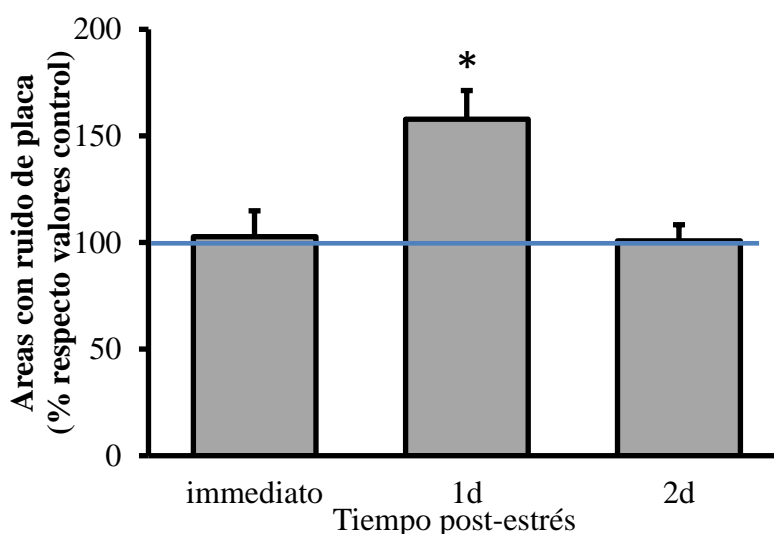


**Figura R. 25. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 24 horas.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPPs. \* $P<0,05$ , n=3 animales para cada serie experimental.

#### 4.5.2.- Electromiografía.

De la misma manera que sucedió con los registros intracelulares posteriores de la aplicación de 3 horas de ultrasonidos, no se produjeron los cambios suficientes para poder considerar este tipo de tratamiento como factor estresante agudo (ver Figura R.26). Referente al número de áreas, aunque inmediatamente no visualizamos ningún tipo de cambio (% de variación respecto a control:  $102,77 \pm 12,1$ ; N=3 animales, n = 36 registros;  $P=1,0$ ), a las 24 horas post-estrés sí se produce un crecimiento significativo del 50% (% de variación respecto a control:  $157,77 \pm 13,51$ ; N=3 animales, n = 36 registros;  $P=0,003$ ) pero se revierte completamente a las 48h (% de variación respecto a control:  $100,83 \pm 7,5$ ; N=4 animales, 48 registros;  $P=1,0$ ).

Respecto a la frecuencia del ruido de placa, los registros inmediatos post-exposición se mantuvieron sin cambios (% de variación respecto a control:  $102,86 \pm 2,3$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,5597), y sí se obtuvo un discreto incremento pero significativo a las 24 horas (% de variación respecto a control:  $129,02 \pm 2,78$ ; N=3 animales, n = 36 registros animales, 36 registros; P=0,0015) y esta vez se mantuvieron un poco dado que a las 48 horas se mantiene elevado aunque ya se puede apreciar un retorno gradual a los valores control (% de variación respecto a control:  $109,35 \pm 2,01$ ; N=4 animales, 48 registros; P=0,0478; ver Figura R.27).

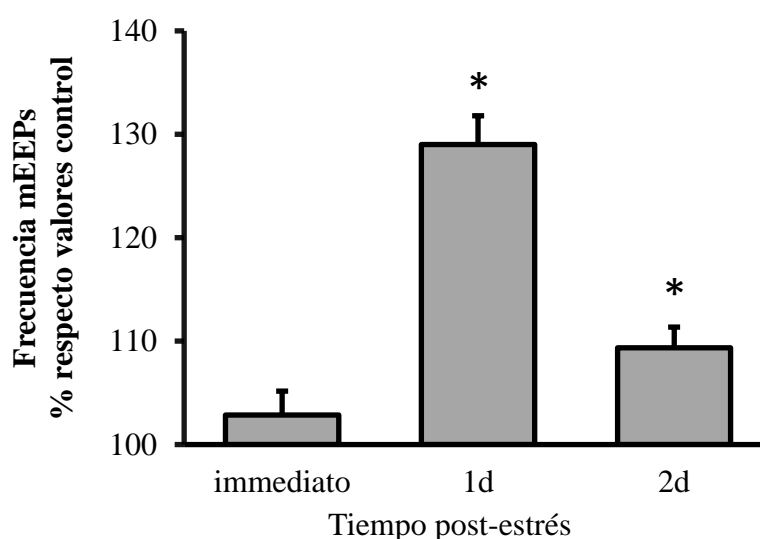


**Figura R. 26. Estrés por ultrasonidos durante 3 horas: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \*P< 0.05, n=3-4 animales para cada grupo experimental.

De todas formas, en ninguno de los dos casos se observa una modificación sustancial en la liberación espontánea de ACh, con lo cual se consideró necesario aumentar el período de exposición a ultrasonidos hasta las 24 horas (Figura R.28). Al igual que sucedió con los registros intracelulares, con este cambio sí se lograron importantes aumentos significativos en el número de áreas con ruido de placa terminal, aunque tampoco de forma inmediata (% de variación respecto a control:  $105,83 \pm 8,85$ ; N=4 animales, n = 48 registros; P=0,5426), llegando al 80% de incremento a las 24h (% de variación respecto a control:  $180,00 \pm 11,54$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0014). Esta subida disminuye progresivamente a las 48 horas, aunque aún elevada de forma significativa (% de variación respecto a control:  $138,88 \pm 5,55$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0195), para estabilizarse por completo como control a los 7 días post-exposición al ultrasonido (% de variación respecto a control:  $94,44 \pm 5,55$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,5066).

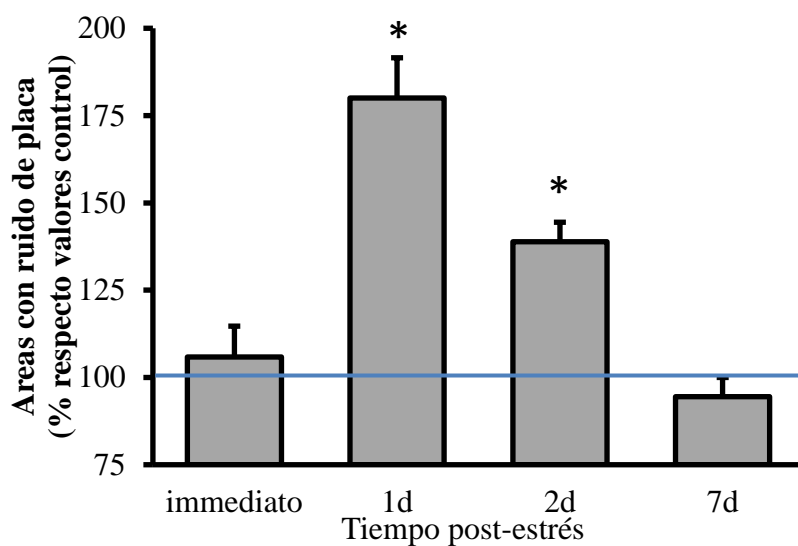


El aumento de la frecuencia de eventos del ruido de placa tampoco apareció de forma inmediata (% de variación respecto a control:  $105,88 \pm 2,09$ ; N=4 animales, n = 48 registros; P=0,1701), y también se hizo significativa con un máximo a las 24 horas de la actuación aunque con unos valores más bajos, (% de variación respecto a control:  $139,42 \pm 3,95$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0006), y paulatinamente volvió a disminuir a las 48 horas (% de variación respecto a control:  $130,68 \pm 4,44$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,00019), para normalizarse prácticamente por completo al 7º día (% de variación respecto a control:  $108,06 \pm 1,89$ ; N=3 animales, n = 36 registros; P=0,0586).

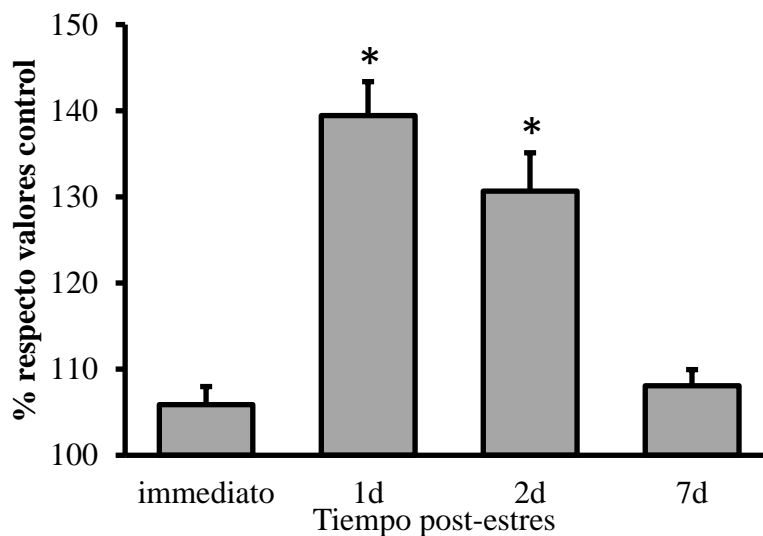


**Figura R. 27. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 3 horas: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas y 48 horas, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de eventos. \*P< 0.05, n=3-4 animales para cada grupo experimental.

Con este estresor se consiguió el quinto tipo de estrés agudo diverso. Notar que los 5 estresores presentaron una dinámica (incremento y vuelta a la normalidad) muy similar entre ellos. Todos los estresores alcanzaron el punto álgido sobre las 24-48 horas posteriores, y con unos valores de frecuencia de mEPPs similares (130-150%). Al mismo tiempo, todos estos estresores consiguieron una disminución progresiva (evidenciada a partir de los 5 días), hasta volver a valores control a los 7 días post-estrés.



**Figura R. 28. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 24 horas: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \* $P < 0.05$ ,  $n=3-4$  animales para cada grupo experimental.



**Figura R. 29. Estrés por exposición a ultrasonidos durante 24 horas: Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 24 horas, 48 horas, 5 días y 7 días, después del estrés específico. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de eventos. \* $P < 0.05$ ,  $n=3-4$  animales para cada grupo experimental.

#### **4.6.- EXPOSICIÓN A ESTRESORES SECUENCIALES.**

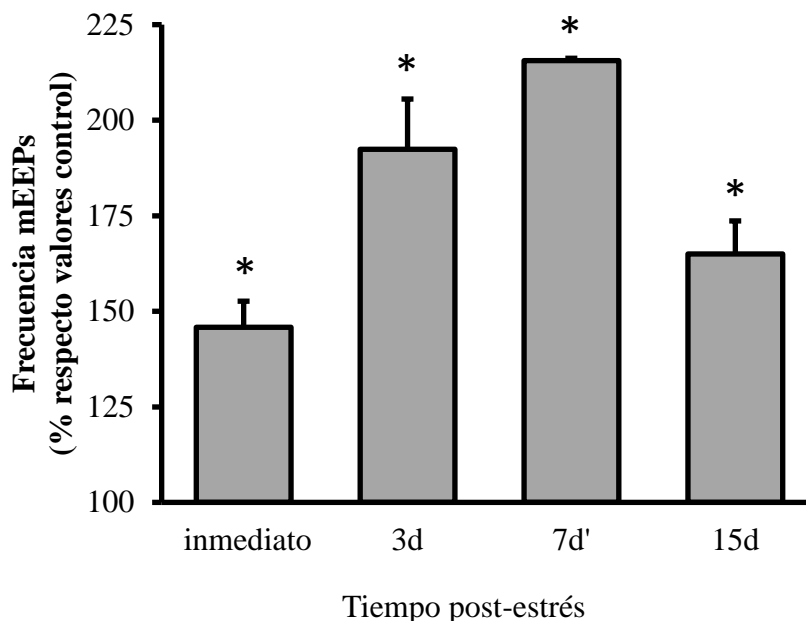
Entendiendo que podría haber algún tipo de habituación de los animales a los estresores aislados, se planteó la evaluación del efecto de estos 5 estresores expuestos de forma secuencial. Así se espera evitar la habituación por un lado y por otro lado crear una nueva forma de estrés crónico que sea suficientemente potente como para generar cambios electrofisiológicos suficientes para generar un posible PGM, y que se mantengan el tiempo suficiente para correlacionarse con cambios a nivel electromiográfico y estructural.

Se propuso estudiar el efecto del estrés combinado a partir de la composición de: 1) se aplicó el estrés mediante ultrasonido durante 24 horas para, pasadas 24 horas de recuperación, proceder a acomodar al animal al siguiente tipo de estrés; 2) privación de comida y agua durante 24 horas; 3) pasadas 24 horas de recuperación correspondientes se aplicó 1 hora de inmovilización; 4) un día después del reposo correspondiente, se sometió a los animales al aislamiento social con jaula metabólica durante un período de 24 horas; 5) finalmente, después de 24 horas de recuperación, se aplicó el último estresor: el FST durante 6 minutos.

##### **4.6.1.- Electrofisiología de registro intracelular.**

Los registros electrofisiológicos ofrecieron los resultados más llamativos de los obtenidos hasta el momento (Figura R.30). Inmediatamente después a la aplicación de este tratamiento, se obtuvo un aumento significativo de la frecuencia de los mEPPs de un 50% (% de variación respecto a control:  $145,78 \pm 6,86$ ; N=50 registros;  $P < 0,0001$ ), lo que significaba un incremento que igualaba o superaba a cualquiera de los ensayados de forma aislada. A partir de este momento, el aumento fue prácticamente el doble a los 3 días posteriores al estrés (% de variación respecto a control:  $192,39 \pm 13,15$ ; N=57 registros;  $P < 0,0001$ ). Encontramos el clímax a los 7 días post-estrés (% de variación respecto a control:  $215,58 \pm 0,62$ ; N=37 registros;  $P < 0,0001$ ), donde observamos un aumento que, hasta el momento, solamente se había obtenido con la aplicación de un anticolinesterásico conocido, la neostigmina (ver Margalef y cols, 2019). Finalmente, a los 15 días evaluados post-tratamiento, aún se obtuvo un incremento sostenido significativamente de un 65% (% de variación respecto a control:  $164,99 \pm 8,66$ ; N=53 registros;  $P < 0,0001$ ). Por otro lado, registramos cambios en la amplitud media de los mEPPs no significativos en el período inmediato a la aplicación del estrés, a los 3 días y a los 7 días post-tratamiento (alrededor de una disminución

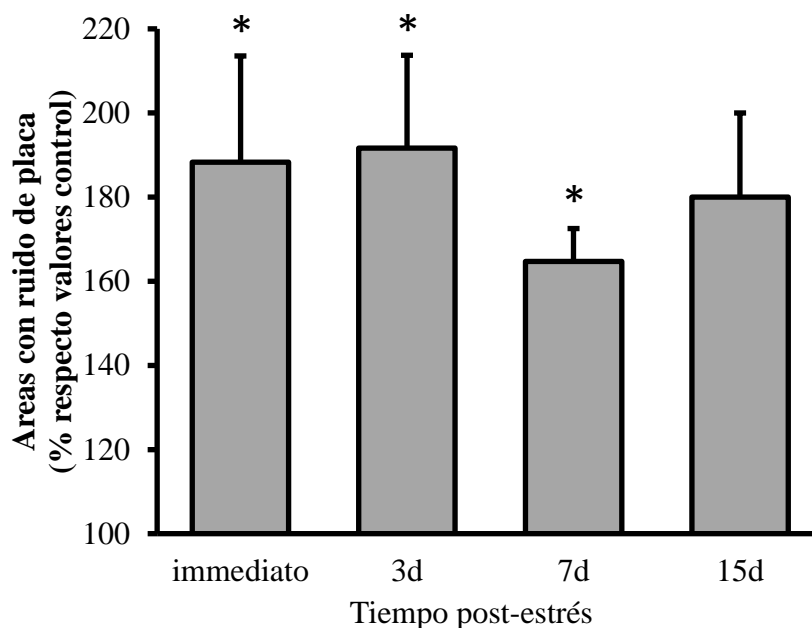
de un 20% en todos los tiempos evaluados) en comparación con los valores control. Con la determinación del potencial de membrana tampoco se detectaron cambios significativos (el máximo % de variación registrado fue de 8,07%).



**Figura R. 30. Exposición a estresores secuenciales durante 8 días: registro intracelular.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 3 días, 7 días y 15 días posteriores a la aplicación del tratamiento. Los valores por encima de 100 indican el incremento producido en la frecuencia de mEPPs. \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$  animales para cada serie experimental.

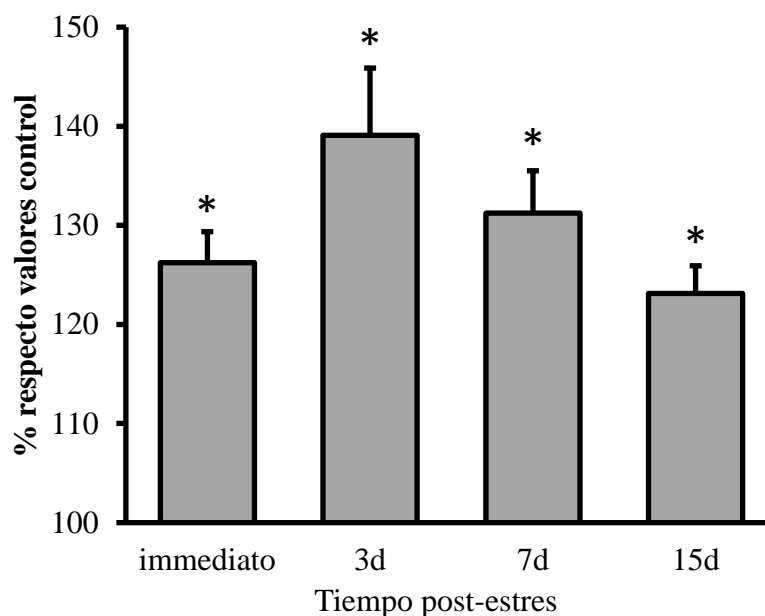
#### 4.6.2.- Electromiografía.

Como sucedió en los registros intracelulares, el número de áreas con ruido de placa mostró un incremento significativo inmediato de un 90% (% de variación respecto a control:  $188,33 \pm 25,22$ ;  $N = 3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P = 0,0118$ ). Este aumento se mantuvo significativo prácticamente invariable a los 3 días (% de variación respecto a control:  $191,66 \pm 22,04$ ;  $N = 3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P = 0,0074$ ), y, aunque aún elevados, a los 7 días hubo una disminución (% de variación respecto a control:  $164,72 \pm 7,81$ ;  $N = 6$  animales,  $n = 72$  registros;  $P < 0,0001$ ). Finalmente, a los 15 días post exposición a la secuencia de estresores, deja de ser significativo, aunque los valores están aumentados (% de variación respecto a control:  $180 \pm 20$ ;  $N = 3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P = 0,0601$ ).



**Figura R. 31. Exposición a estresores secuenciales durante 8 días: Áreas con ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento en el eje de las abscisas se evaluó inmediatamente, 3 días, 7 días y 15 días posteriores a la aplicación del tratamiento. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de áreas. \* $P < 0.05$ ,  $n = 3-6$  animales para cada grupo experimental.

Respecto a la frecuencia de eventos del ruido de placa, también se observó un incremento inmediato (% de variación respecto a control:  $126,23 \pm 3,12$ ;  $N = 3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P = 0,0011$ ) con un clímax a los 3 días post-tratamiento (% de variación respecto a control:  $139,08 \pm 6,79$ ;  $N = 3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P = 0,014$ ), y aunque durante los primeros 7 días esta frecuencia siguió significativamente elevada (% de variación respecto a control:  $131,23 \pm 4,28$ ;  $N = 6$  animales,  $n = 72$  registros;  $P < 0,0001$ ), encontramos una disminución progresiva hasta llegar a un 25% a los 15 días posteriores a la exposición (% de variación respecto a control:  $123,13 \pm 2,79$ ;  $N = 3$  animales,  $n = 36$  registros;  $P = 0,0129$ ).

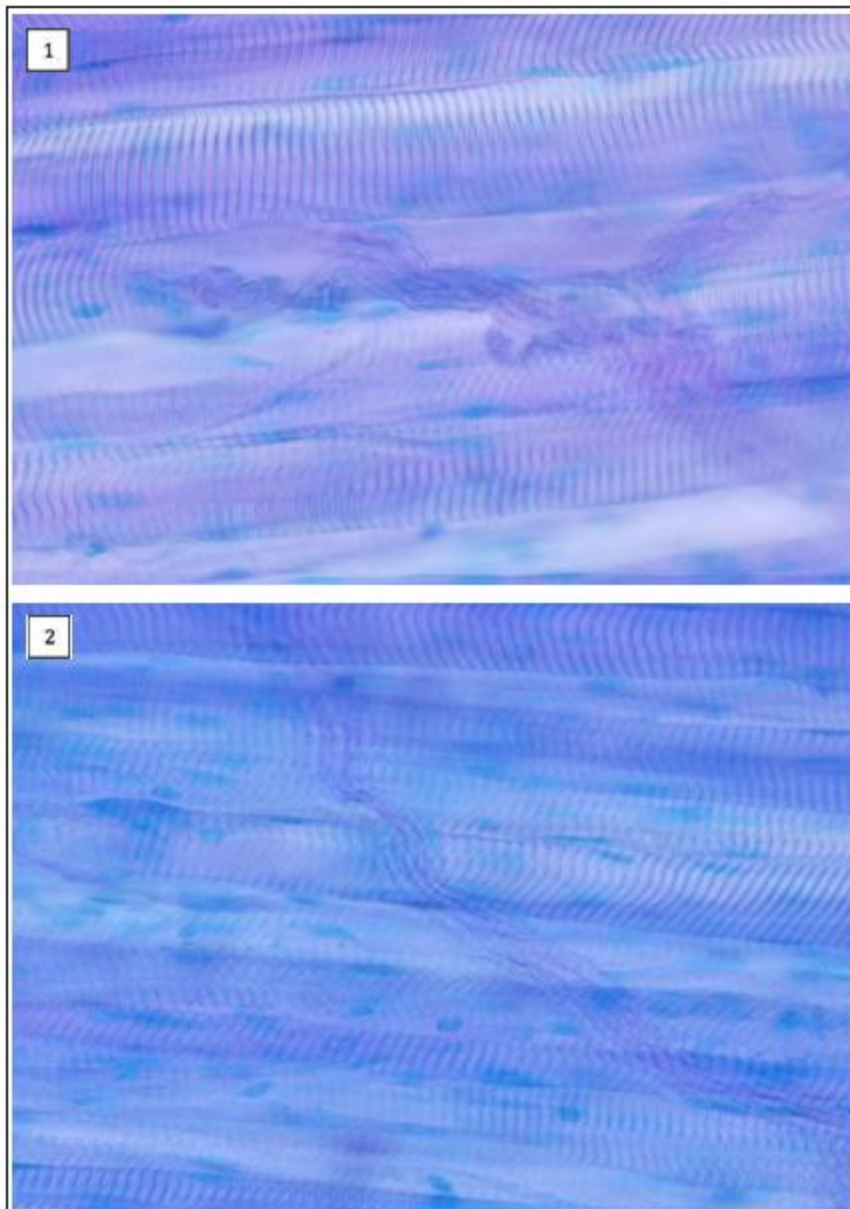


**Figura R. 32. Exposición a estresores secuenciales durante 8 días. Frecuencia de aparición de eventos de ruido de placa.** Porcentaje de valor experimental con respecto al control en el eje de las ordenadas y tiempo post-tratamiento en eje de las abscisas. El tiempo post-tratamiento se evaluó inmediatamente, 3 días, 7 días y 15 días posteriores a la aplicación del tratamiento. Los valores por encima de 100 indican un incremento en el número de eventos. \* $P < 0.05$ ,  $n=3-6$  animales para cada grupo experimental.

#### 4.6.3.- Tinción PAS-ALCIÁN.

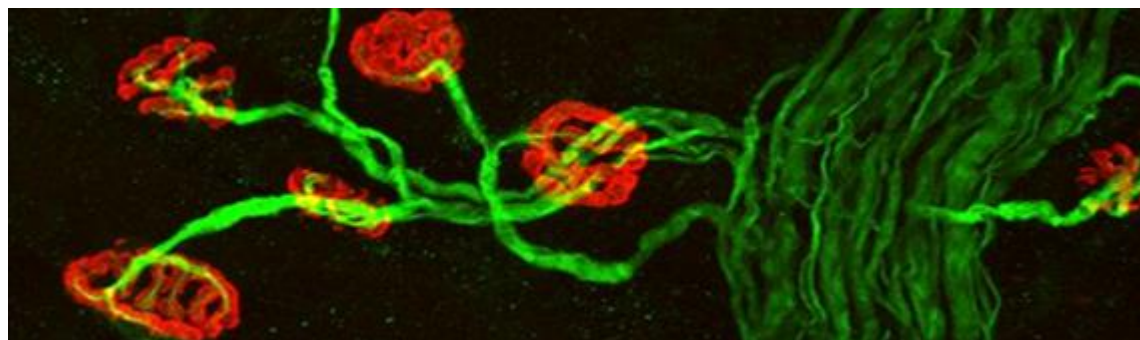
Como se ha comentado, la aportación individual de los distintos estresores estudiados no fue suficiente para la observación de cambios estructurales en el tejido evaluado. Sin embargo, la exposición combinada a nivel electrofisiológico muestra unos resultados sugestivos que pueden a nivel histológico provocar que aparezcan glucosaminoglicanos extracelulares (GAG) y que se asocien a imágenes nodulares tan características descritas previamente como nodos de contracción (Simons y cols., 1999; Margalef y cols., 2019).

Se realizó la tinción de los músculos LAL de animales que presentaban un mayor incremento de su actividad neuromuscular, es decir a los 3 días y a los 7 días. Las imágenes obtenidas presentaban muchas similitudes entre ellas. Visualizadas a gran aumento se puede observar la coloración roja/rosada, indicativa de la presencia de GAGs neutros, y la coloración azulada, correspondiente a la identificación de GAGs ácidos. Lamentablemente, en ambos períodos, ninguna de las imágenes obtenidas tampoco mostró la existencia clara de nodos de contracción. Si bien se puede advertir un engrosamiento local de alguna de las fibras, no se visualiza un acortamiento claro de los sarcómeros correspondientes; ver Figura R.33).



**Figura R. 33. Exposición a estresores secuenciales. Tinción PAS-Alcián. 1) Muestra correspondiente a 3 días post-tratamiento.** Se puede observar un cierto engrosamiento focal sin llegar a la categoría de nodo de contracción. Los tonos rosados y azulados revelan la existencia de GAGs. Aumento inicial 200X. **2) Muestra correspondiente a 7 días post-tratamiento.** No se observan nodos de contracción claramente establecidos. Aumento inicial 200X.

## 5.- DISCUSIÓN.







Al relacionar los resultados obtenidos con ratones con el estrés en humanos, hay que tener en cuenta las principales discrepancias entre estas 2 especies, y también los métodos utilizados para analizar el estrés. Debido a estas disparidades, las extrapolaciones pertinentes de los efectos neuromusculares del estrés psicológico en el ratón y en el ser humano se han de realizar con suma precaución (Borsini, 2012). Uno de los motivos principales de esta afirmación la podemos encontrar precisamente en las características que describen al propio estrés psicofísico que usamos en este estudio como factor básico para poder evaluar los cambios que se producen a nivel neuromuscular. Este tipo de estrés, habitualmente usado por varios autores, está marcado por un estado de angustia, desencadenado por el procesamiento cognitivo de una serie de eventos adversos y que desemboca como resultado en forma de emociones negativas asociadas a una evidente respuesta de estrés fisiológica (Chrousos y Gold, 1992; Simonov, 1997), y se encuentra asociado a otros tipos de estresores que pueden estar directamente asociados con emociones negativas y con una relación estrecha con elementos manifestados en este tipo de estrés, como por ejemplo, el aumento de los signos de ansiedad y desesperación posteriores al estrés físico, el dolor, o los aumentos en la actividad neuromuscular o en la actividad de factores inflamatorios inducidos, entre otros.

Por este motivo, es un desafío el hecho de intentar extrapolar la neurobiología de estos factores estresantes en animales en general, y en roedores específicamente con los seres humanos. Por lo tanto, el estudio se centra en evaluar solamente aquellos parámetros objetivos para determinar cambios asociados a este estrés psicofísico inducido, ya sea mediante métodos de tinción para determinar posibles cambios morfológicos, como determinando cambios electrofisiológicos.

### **5.1.- REGISTRO INTRACELULAR Y ELECTROMIOGRAFÍA EN EL ESTUDIO DE LOS PGM.**

Aunque existe actualmente bibliografía justificando los PGM como fenómenos electrofisiológicos (Gerwin, 1994; Margalef y cols., 2019), hay muy pocos estudios que relacionen en detalle el desarrollo de puntos desencadenantes con el uso de la electromiografía (EMG), y todavía menos que lo justifiquen mediante la utilización de registro intracelular (EFG). De hecho, solamente en nuestro laboratorio se ha realizado esta asociación (Margalef y cols., 2019). Clásicamente, sí se ha relacionado el ruido de placa con los PGM, y, por lo tanto, hay algunos trabajos en esa dirección (ver el apartado de Introducción).

Para poder valorar adecuadamente la actividad neuromuscular, es necesario hacer uso de técnicas invasivas, mediante electrodos de hilo o aguja (Hubbard y Berkoff, 1993; McNulty y cols., 1994; Simons y cols., 2002b). De todas formas, el ruido de placa es aún un parámetro bastante controvertido. Por un lado, presenta la dificultad de afirmar si la actividad eléctrica anormal es el resultado de la actividad de los PGM localizados (Couppé y cols., 2001; Simons y cols., 2002a; Kuan y cols., 2007) o simplemente es indicativo de la existencia y funcionamiento de los contactos sinápticos (Kimura, 2001). De hecho, Simons y colaboradores (2002b) evaluaron la especificidad de los potenciales de placa en los PGMs y concluyeron que el ruido de placa era significativamente más frecuente en puntos miofasciales activos en comparación con puntos alejados de esta zona activa, pero siempre cercano al contacto sináptico, describiéndolo como un aspecto característico de un PGM, pero sin estar restringido solo a este tipo de entidad. Esta afirmación está apoyada por otros autores que lo ven como un dato complementario para la confirmación del diagnóstico de PGM (Gerwin, 1997). De todas formas, todos estos autores coinciden en que el ruido de placa es una extrapolación directa de la neurotransmisión espontánea. Según la hipótesis integrada el registro de esta actividad es debido a una anómala liberación de ACh espontánea y, por lo tanto, será trascendental poder evaluar los cambios que se producen en la frecuencia de eventos del ruido de placa, y así poder cuantificarlos. Para poder identificar electromiográficamente de manera fiable la actividad eléctrica espontánea que se encuentra en un sitio activo será necesario utilizar una amplificación y velocidad de barrido relativamente altas (Simons y cols., 2002b). En ocasiones y debido a esta mayor amplificación sucede que los picos de las espigas pueden quedar fuera de escala. Sin embargo, son evidentes ya que la forma bifásica con la que se desvía la línea de base es característica. Hay que recordar que los potenciales de placa terminal en miniatura (mEPPs) son causados por la liberación de una única cuanta de ACh que activa los receptores, provocando una entrada de sodio que aumenta ligeramente el potencial de membrana de la fibra muscular durante un lapso de pocos milisegundos. El análisis del ruido de placa inducido por un incremento experimental de ACh (Colquhoun y Sakmann, 1985) no solo permite caracterizar los distintos receptores y ayuda a clarificar que los mEPPs procedentes de la actividad de varias sinapsis (Wiederholt, 1968) sino que son los que determinan la aparición del ruido de placa.

El ruido de placa obtenido en todos los experimentos realizados en esta tesis se obtuvo mediante un electrodo de aguja monopolar; hay que tener en cuenta que si comparamos las dimensiones de la aguja (normalmente alrededor de unas 400  $\mu\text{m}$ ) con el diámetro medio de una fibra muscular (que se encuentra entre 37 y 44  $\mu\text{m}$ ) es

fácilmente deducible que el contacto de la punta se producirá siempre con un grupo de miocitos a la vez. Con esta técnica resulta imposible registrar los mEPPs de una única fibra con una aguja tan grande, ya que sus potenciales se propagan a una distancia muy corta a lo largo de la superficie de la membrana postsináptica, y solo se pueden obtener adecuadamente mediante el registro intracelular. No obstante, la acumulación de los registros de varias fibras a la vez que se encuentren en un sitio activo característico de un PGM permite cuantificar el porcentaje de cambio que existe en la actividad eléctrica de esta zona respecto a la actividad de otra área que no se encuentre alterada.

Otra de las cuestiones importantes es determinar si la información obtenida de los animales puede ser extrapolable a la que se puede obtener examinando áreas activas en humanos. En este sentido hay antecedentes. Simons y colaboradores determinaron que los potenciales pertenecientes en los PGM de conejos tenían el mismo carácter que los identificados en las uniones neuromusculares y PGM en humanos (Simons y cols., 1995).

Como se ha determinado anteriormente, varios estudios relacionan el ruido de placa como aparición causal de la neurotransmisión espontánea muscular (Maselli, 1997; van Putten y cols., 2002). Partiendo de la premisa que existe relación entre el ruido de placa y el PGM, y que en estas áreas es más fácil registrar actividad eléctrica espontánea (Couppé y cols., 2001), el registro electromiográfico posterior a la aplicación de estrés es una herramienta útil y relacionable con el síndrome de dolor miofascial.

Muchos autores coinciden en que el ruido de placa es una traducción directa de la actividad sináptica espontánea (Kimura, 2001; Simons y cols., 2002b; Kuan y cols., 2007) y así será relevante evaluar el número de áreas y la frecuencia de los eventos del ruido de placa como el hecho de comparar estos datos con los obtenidos mediante el registro intracelular. Tal como se ha podido observar en los experimentos de los diferentes factores estresantes evaluados individualmente las alteraciones registradas intracelularmente y las registradas con EMG no se comportan exactamente igual. Eso es debido a que el primero se trata de una técnica más sensible y específica, y, por lo tanto, tiene la capacidad de detectar cambios más sutiles. Sin embargo, en las distintas fases experimentales a lo largo de la tesis observamos muchas similitudes en cuanto a los resultados obtenidos mediante el uso de ambas técnicas.

Por lo que se refiere al registro intracelular, esta técnica sí que nos permite registrar los mEPPs de una única fibra muscular y así poder interpretar la actividad neuromuscular de este músculo. Por un lado, no se obtuvieron cambios significativos registrados en la amplitud media de los mEPPs, tanto durante la aplicación de cada

uno de los estresores estudiados en esta tesis, como en su formato combinado, en ningún período post-tratamiento. Recordar que se analizó este parámetro para valorar si aparecía alguna afectación funcional de las fibras musculares y en qué circunstancia se encontraba el componente postsináptico de cada fibra analizada. Por lo tanto, con los resultados obtenidos se puede afirmar que el estrés agudo o crónico inducido en esta tesis no afecta al normal funcionalismo de las fibras musculares, y en ningún caso condujeron hacia una disminución evidente de la respuesta postsináptica por estimulación repetitiva (Del Castillo y Katz, 1954). Por otro lado, mediante el sumatorio de la frecuencia de los potenciales de placa espontáneos registrados en los miocitos analizados, y la media representativa de estas frecuencias en los distintos tiempos estudiados, podemos reproducir la fisiología neuromuscular posterior a una situación de estrés específica. Los cambios significativos detectados a lo largo del estudio nos informan de la afectación que se produce a nivel presináptico, y confirma que el número de vesículas de acetilcolina que se liberan estocásticamente aparece incrementado cuando se aplica estrés, influyendo directamente en el correcto desarrollo y función tanto de los circuitos neuronales como de la propia estructura muscular (Kavalali y cols., 2011; Peled y cols., 2014).

Hay que recordar que la liberación espontánea de la ACh parece ser el eje central por donde pivota toda la hipótesis integrada: un exceso en la secreción de acetilcolina (ACh) termina siendo la responsable del inicio de una cascada de eventos, que conduce a la aparición de los nodos de contracción y a la clínica que caracteriza el SDM (Simons, 1995; Gerwin y cols., 2004). Así, aumentando la acetilcolina en la hendidura sináptica en cantidad y duración suficiente, se puede obtener la generación y/o perpetuación de PGM en animales. Puede sorprender que este aumento termine provocando, a su vez, un incremento mayor en la secreción de más ACh. Este es un fenómeno analizado en nuestro laboratorio en varias ocasiones. Resumidamente, la acetilcolina secretada por el axón termina por activar unos receptores situados en la membrana axonal sináptica (autoreceptores metabotrópicos) como los receptores muscarínicos (mAChR tipo 1 y 2). El cómputo global de la activación sincrónica de los estos dos receptores aumenta la liberación de acetilcolina vía la activación de las proteínas quinasas C y A (Santafé y cols., 2006). Además, durante la neurotransmisión también se liberan compuestos de adenosina, y está descrito que esta también interviene directamente en la modulación de la liberación de la ACh (Santafé y cols., 2015).

Por lo tanto, el registro electrofisiológico será imprescindible para detectar estas variaciones en la hendidura sináptica, de una forma mucho más precisa que la electromiografía, y complementariamente a esa, permiten una aproximación en las

distintas posibilidades fisiológicas existentes en la generación de los PGM y de su perpetuación y/o cronificación.

## **5.2.- TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.**

En vista a la experiencia obtenida en estudios anteriores de nuestro laboratorio (Margalef y cols., 2019) pareció conveniente aplicar la técnica de PAS-Alcián, ya que es ideal para poder identificar áreas que puedan presentar GAGs, y, por lo tanto, marcar de forma indirecta aquellas zonas que puedan incluir nodos de contracción. Gracias a esta experiencia previa, se estimó que a valores por debajo de 200% de incremento de la neurotransmisión espontánea no era posible obtener imágenes de nodos de contracción. Así mismo, a los animales a los que se les impuso una secuencia de estrés variado crónico, y mediante los cuales se obtuvieron importantes cambios electrofisiológicos, se esperaba encontrar nodos de contracción. Lamentablemente no fue así en ninguno de los períodos post-tratamiento estudiados, aunque se obtuvieron imágenes altamente sugestivas.

Como se ha comentado anteriormente, la aportación científica sobre la existencia de los nodos de contracción en un PGM (Ballyns y cols., 2011; Turo y cols., 2013) hasta el momento, no describen ninguna imagen bien definida de PGM obtenida de una muestra humana. De hecho, la imagen más clarificadora de esta entidad fue obtenida y publicada durante la fase experimental en nuestro laboratorio de la creación de un modelo de PGM en roedores (Margalef y cols., 2019). Anteriormente, en otro equipo de investigación ya se había creado un modelo de PGM en ratas mediante el uso de contusiones repetidas (Huang y cols., 2013) y, aunque obtuvieron registros electrofisiológicos con aumentos del ruido de placa, en el apartado histológico no encontraron nodos de contracción, sino simplemente signos indirectos a través de la presencia de una anormal dilatación en las fibras musculares, apreciable tanto en su plano transversal como longitudinal. Posteriormente, este mismo grupo (Liu y cols., 2019) y con el uso de técnicas histoquímicas específicas obtuvieron imágenes de nodos de contracción muy similares a las obtenidas por nuestro departamento. La búsqueda de la imagen del nodo de contracción ha sido una de las quimeras a las que se han enfrentado muchos investigadores en el tema, la mayoría de las veces, sin éxito. Mense y colaboradores (2003) fueron pioneros en este ámbito cuando, siguiendo las directrices de la hipótesis integrada, aumentaron experimentalmente la cantidad de ACh presente en la hendidura sináptica evitando su hidrólisis por la acción un anticolinesterásico que al mismo tiempo es autofluorescente que es el "diisopropyl

fluorophosphate” o DFP. De esta manera, a parte de favorecer la aparición de nodos de contracción, su función como fluorocromo permitía también monitorizar las sinapsis neuromusculares tratadas e identificar el área subsináptica al miocito afectado. Sin embargo, no obtuvieron los resultados esperados (probablemente por la propia acción del anticolinesterásico usado, que resultaba insuficiente), así que sobreimpusieron corrientes eléctricas a los músculos tratados con DFP. La lesión muscular que se generó a partir de esta nueva propuesta no permitió apreciar posibles cambios neuromusculares. En otros estudios previos en que se evaluó las posibles reacciones adversas que podían generar los anticolinesterásicos usados en el tratamiento de la *miastenia gravis* obtuvieron imágenes de microscopía electrónica compatibles a los descritos como nodos de contracción característicos de un PGM (Hudson y cols., 1978; Duxson y Vrbová, 1985). En nuestro laboratorio, con una dosis única de neostigmina se obtuvo el mayor incremento de frecuencia (~300%) que se ha obtenido en ninguna situación experimental en nuestro laboratorio hasta el momento. En esa ocasión sí se obtuvieron nodos de contracción fácilmente (Margalef y cols., 2019). El máximo aumento de mEPPs que encontramos en la presente tesis, aunque muy elevado, es menor (~200%). Eso podría justificar la ausencia de nodos de contracción en las muestras analizadas. Es decir, que los cambios funcionales obtenidos serían suficientes para corroborar alteraciones en la actividad neuromuscular pero insuficientes para generar cambios morfológicos.

### **5.3.- MODELO ANIMAL DEL ESTRÉS AGUDO.**

Uno de los puntos que se intentaron dilucidar en esta tesis fue si realmente la participación del estrés puede estar relacionado en la posible generación de PGM. Existen estudios que debaten la posibilidad de una posible relación entre el estrés y el SDM, tanto en animales (Chen y cols., 1998) como en humanos (McNulty y cols., 1994) que sustentan esta hipótesis.

En este tipo de estudios, el número de sujetos requerido para el experimento puede ser pequeño ya que se ha demostrado que mostrará un aumento lineal a medida que se agreguen más animales y grupos de tratamiento (Tsukiyama y cols., 2011). Esto permite reducir el tamaño de la muestra y ceñirse bien a los criterios éticos de la experimentación marcados por la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea de noviembre de 1986 (86/609/EEC) para la manipulación de animales de laboratorio, y contemplando las directrices establecidas en la ley 5/1995, del 21 de junio, de protección de los animales usados para la experimentación y por otras

finalidades científicas, aprobada por el Parlamento de Catalunya (Directiva 86/609/EEC).

Una de las ventajas de los estudios agudos es que generalmente son terminales (se sacrifica al animal al final del proceso), y que presentan un pico de actuación y una vuelta a la normalidad posterior. Esto permite recopilar múltiples factores del animal, y generar una curva de evolución cerrada del experimento (Patchev, 2006).

Partiendo de la premisa que para este estudio se requieren estresores psicológicos agudos, está descrito que el estrés psicofísico (estrés psicológico con un fuerte componente físico asociado), tiene mucha más repercusión en el comportamiento del dolor que el uso de un estresor psicológico puro. En este sentido, La Porta y Tappe-Theodor (2020) publicaron recientemente un modelo de dolor lumbar miofascial en ratón, creado por la inyección de factores de crecimiento neuronales (NGF) en los músculos de la espalda del animal. Estos autores obtuvieron cambios significativos cuando se añadía un paradigma psicofísico, lo que no sucedía cuando este modelo se asociaba a un paradigma de estrés únicamente psicológico. De la misma forma que pasa con la lumbalgia, se sabe que el estrés psicológico y físico está asociado a cambios en la actividad neuromuscular periférica (Bongers y cols., 1993), aunque la relación causal, los mecanismos que lo establecen y los mediadores que actúan aún no se han dilucidado y, hasta el momento, no existe un modelo que contribuya a su traducción clínica.

Además, hay que tener en cuenta la dificultad de utilizar un estresor puramente psicológico en animales. Por ejemplo, la mayoría de los dispositivos aptos para restricción del movimiento en ratones (una forma de estrés descrita en la bibliografía como puramente psicológica) son susceptibles a provocar un estrés físico secundario y, aunque sea en menor medida, puede tener influencia directa en los resultados obtenidos (Kala y cols., 2016). Aumentos en la temperatura corporal del animal, incomodidad en el confinamiento o durante la realización de la prueba, o la posibilidad de que exista una ventilación reducida, pueden ser algunos de estas formas de estrés físico asociado. Todos estos factores han sido contemplados para elegir el tipo de estrés en esta tesis.

#### **5.4.- ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN.**

La inmovilización es un estresor ampliamente utilizado y, de sencilla aplicación. La mayoría de los inmovilizadores utilizados en la investigación del estrés en ratones



son tubos cilíndricos como los usados en la presente tesis (Son y cols., 2019). Todos estos modelos permiten el monitoreo de los roedores a través de unos agujeros que al mismo tiempo también sirven para que el animal pueda tener una ventilación adecuada.

Existen estudios que corroboran la eficacia del uso de la restricción de la movilidad para el desarrollo de estrés psicológico en ratones (Kala y cols., 2016). Sin embargo, hay que distinguir entre “inmovilización” y “restricción de movimientos”. El primero es indicativo de un estímulo estresante tanto de naturaleza física como psicológica, y, por lo tanto, es más intenso que la propia restricción de movimientos, ya que evita cualquier movimiento o giro del animal sometido al experimento (Wood y cols., 2008).

Con el registro intracelular se obtuvo un incremento de la frecuencia de los mEPPs tanto de forma inmediata como evaluada a los 5 días. Sin embargo, el incremento de mEPPs era relativamente bajo para generar nodos de contracción. Por otro lado, respecto los registros electromiográficos, la frecuencia del ruido de placa no tuvo variaciones respecto el control, y solo se obtuvo un incremento inicial del número de las áreas. Con la idea de generar un estrés más determinante y, por lo tanto, unos resultados más relevantes, se sometió a los ratones a 1 hora de inmovilización cada día durante 5 días consecutivos. Sorprendentemente, los resultados obtenidos en esta segunda metodología de inmovilización fueron idénticos a los obtenidos con los animales sometidos a una única 1 hora de inmovilización. Es evidente que se produjo un fenómeno de habituación: los animales solamente se estresaron durante las primeras horas, y el resto del tiempo les fue redundante, no les estresó.

En un inicio, la idea de aplicar una forma de estrés homotípica repetida era esencial para que hubiera el mínimo sesgo entre animales y así, basar los resultados en un único factor estresante (la inmovilización). Está aceptado que, en estudios a corto y largo plazo de exposición a estresores, sea determinante el hecho de que el animal pueda presentar una historia previa estresante, ya que esto puede terminar alterando la respuesta generada frente a situaciones similares, o incluso, distintas (Nadal y Armario, 2010). Es decir, se evalúa si aplicar un mismo estímulo repetidamente en días consecutivos puede terminar generando un estrés crónico en los roedores. De hecho, existen algunos estudios que apoyan esta idea. Está descrito que estímulos físicos, como la inmovilización, terminan sensibilizando los niveles circulantes de corticosterona (una de las principales hormonas del estrés) sobre todo con el paso del tiempo (Barnum y cols., 2007). De todas formas, generalmente esta metodología se usa para la investigación de la adaptación de los animales a un circuito de estrés (psicológico, físico o una combinación de ambos) y para comprender mejor

todos aquellos mecanismos plásticos de la propia respuesta al estrés. Es decir que no son utilizados para examinar la carga que supone la aplicación de un estrés crónico en el organismo, como es el caso de la presente tesis.

A favor de la combinación de estresores cabe destacar que, habitualmente, la exposición diaria a una misma situación estresante reduce mucho la capacidad de generar respuestas fisiológicas y conductuales a la misma situación, mientras que la respuesta a estímulos nuevos para el animal permite que estas respuestas se mantengan, o incluso se encuentren potenciadas (Martí y Armario, 1998; Armario y cols., 2008).

Como se ha comentado, la reducción de la respuesta fisiológica posterior a una exposición repetida al mismo estímulo (homotípico) es conocida como fenómeno de adaptación o habituación. La habituación es una de las formas más simples de aprendizaje no asociativo, y ocurre cuando un organismo reduce o termina suprimiendo su respuesta a un estímulo continuo y persistente (Thompson y Spencer, 1966). La reducción de la respuesta puede durar minutos, horas, o días, dependiendo del tipo de estímulo realizado, y también del experimento que se esté desarrollando (Pletnicov y cols., 1995).

Gracias al uso de tests de reconocimiento de objetos, se sabe que, dentro de todos los aspectos del aprendizaje y la memoria, los ratones tienen una innata preferencia para los estímulos nuevos, y esto demuestra que no son necesarios refuerzos positivos o negativos, ni programas de entrenamiento excesivamente largos (Lueptow, 2017). En varios estudios se ha observado que, en situaciones estresantes, los ratones acostumbran a mostrar inicialmente una conducta evitativa (neofobia) y con tendencia a la rápida habituación como una forma de respuesta adaptativa al experimento. En este sentido, Boleij y colaboradores (2014) estudiaron una peculiar habituación al estrés por un protocolo de inestabilidad social prolongada y concluyeron que, aunque los ratones presentaban síntomas fisiológicos y centrales relacionados con la ansiedad, la respuesta que se produjo fue a corto plazo y no generó cambios conductuales mantenidos. Estos hechos manifiestan claramente la capacidad de adaptación a estímulos repetitivos de los roedores. En otros términos, la intervención de un factor estresante aislado, aunque sea mantenido en el tiempo, no induce cambios morfológicos ni neuromusculares, justificándose así los resultados obtenidos en la presente tesis con los estresores agudos.

Actualmente, hay muy pocos datos que permitan extrapolar estos resultados de la habituación encontrados en animales a humanos. Schommer y colaboradores (2003) realizaron un estudio mediante la aplicación de estrés psicosocial (*Trier Test*) en humanos y observaron una reducción de los niveles de cortisol y hormona

corticotropina. Esto apoya la teoría de la disminución de la respuesta al estrés posterior a la exposición repetida a una misma situación estresante. Sin embargo, estos resultados no coincidían con la valoración subjetiva de los participantes, ni tampoco con los niveles de adrenalina o noradrenalina presentes, y, por lo tanto, obtuvieron una disociación psico-orgánica.

La exposición crónica a situaciones estresantes de elevada intensidad, poco previsible, y con una falta de control sobre ellas, permite y maximiza la aparición de patologías o disfunciones asociadas directamente con el estrés (McEwen, 2007). Así, el siguiente paso en esta tesis fue determinar una batería de estresores agudos distintos para poder crear una exposición crónica que permitiese observar cambios significativos y duraderos en la morfología muscular y en la actividad neuromuscular.

### **5.5.- ESTRÉS POR FST (*FORCED SWIM TEST*).**

Los factores estresantes como la natación forzada son una forma de estrés que, igual que pasaba con la inmovilización, cae en la categoría psicofísica. Se trata de un estrés con un componente psicológico claro y, además, la actividad física que requiere también genera una respuesta al estrés independiente de cualquier variable psicológica.

El FST fue descrito inicialmente por Porsolt y colaboradores (1977a) como modelo para el análisis del comportamiento. En esta tesis se escogió este test como mecanismo estresor agudo por la implicación de un estímulo físico, como es el hecho de la imposición de la natación mantenida durante un tiempo determinado, con un componente psicológico asociado, que en este caso sería la exposición a la novedad, combinado con la incomodidad del confinamiento y la limitación de posibilidades de supervivencia, activando comportamientos fenotípicos de afrontamiento al estrés adecuados (como, por ejemplo, una alta actividad simpática; Skoluda y cols., 2015).

En ratones, el procedimiento clásicamente descrito (Porsolt y cols., 1977b) consiste en introducir el animal de experimentación en un cilindro de plexiglás de 25 cms de alto y 10 cm de diámetro con agua a una altura de 10 cm a una temperatura de 21-23°C (sin la realización de pretest). La sesión tiene una duración de 6 minutos. Aún así, la introducción de pequeñas modificaciones en la utilización de la prueba es una constante en las abundantes publicaciones derivadas de este método. Actualmente, en la literatura encontramos dos grandes estrategias para el uso del FST: por un lado, usado como prueba de criba, a nivel farmacológico, en el análisis de la actividad antidepressiva; y, por otro lado, como fuente de estudio de la situación conductual,

mediante la cual se ha intentado dar una explicación a la conducta de inmovilidad, y su relación con las características típicas de la depresión humana (Hawkins y cols., 1980). Esta descrito que hay un momento en estas metodologías en el que los animales se “deprimen” dejando de luchar por su supervivencia y, por lo tanto, dejando de nadar. Hasta el momento, el FST no se ha utilizado como forma de estrés agudo, sino siempre como herramienta de evaluación. Al consistir en una prueba en la que se somete al animal a una situación en la que el escape es imposible, se consideró como factor estresante, aunque fueron necesarias una serie de adaptaciones para que el resultado fuera lo más objetivo posible.

Una primera modificación fue la utilización de un espacio con diferentes medidas en el diámetro; en este caso, el cilindro de plástico que utilizamos (medidas de 40 cm de alto y 20 cm de diámetro, llenado con agua hasta una altura aproximada de unos 20-25 cm) era más grande del utilizado en la descripción del test original. El motivo principal fue que interesaba permitir cierto grado de movilidad al ratón, para que pudiese desarrollar sin problemas el estrés provocado sin estar condicionado por un espacio de dimensiones reducidas, como es el caso de la mayoría de los FST evaluados, en los que el principal aliciente era la evaluación de la inmovilidad. Además, existen estudios que también presentan cambios en la ampliación del tamaño del cilindro usado en las pruebas (Hilakivi-Clarke LA y cols., 1990; Murua y Molina, 1990). Teniendo en cuenta las nuevas dimensiones del espacio, también hubo que cambiar el nivel del agua, aunque este dato también se encuentra validado a través de otras investigaciones que también utilizan el FST (De Pablo y cols., 1989). Otra variación aplicada en un inicio fue elevar la temperatura del agua a 37°C, con la intención de eliminar el frío como factor estresante añadido, como otros autores que ya habían trabajado previamente con el FST a esta temperatura (Thornton y cols., 1990). Se mantuvo la duración del test original a 6 minutos porque es el mínimo tiempo suficiente para que el ratón desarrolle estrés sin que presente signos depresivos ni fatiga muscular por la natación.

Inicialmente, tal como hemos comentado, el objetivo fue aplicar un estímulo estresante puro, y poder aislar los efectos generados por la combinación de varios de estos. Así se decidió someter el FST a los roedores a una temperatura de 37°C. Si bien el FST está descrito a una temperatura de 21°C, permitiendo una variación de  $\pm 2^\circ\text{C}$  (Porsolt y cols., 1977b). La relación entre el estrés y el frío se encuentra suficientemente documentada, ya sea mediante la combinación con otros factores estresantes como, por ejemplo, la inmovilización (Kulkarni y Juvekar, 2008; Saxena y Singh, 2017) o mediante la aplicación repetitiva de frío sin restricción de movimiento como forma de estrés aislada (Miyamoto y cols., 2017). Aunque en estos estudios la

temperatura determinada sea especialmente baja, denotan su influencia y su participación como factor estresante agudo. Por este motivo, al realizar el test a 37°C, se pretendía que el frío no influya directamente sobre el músculo del animal ni que se generen reacciones autonómicas indeseables. De todas formas, no solamente no se obtuvieron cambios, sino que se podría llegar a describir un efecto parcialmente ansiolítico, tanto por el comportamiento tranquilo que presentaban los animales durante el proceso de experimentación y posterior a este, como por la visible disminución de los valores de la actividad neuromuscular, todos ellos por debajo del propio control. Pese a ello, estos experimentos permitieron extraer una conclusión: no es posible que el ejercicio de nadar durante 6 minutos induzca un incremento en la neurotransmisión espontánea. Hay bibliografía previa que apoya esto (ver por ejemplo Jafri, 2014). Aún a sabiendas de que la hiperactividad muscular puede no ser suficiente para explicar el desarrollo y/o mantenimiento del SDM (Intrieri y cols., 1994), había la posibilidad de que esta actividad sobreimpuesta pudiera generar cambios significativos en la actividad neuromuscular. Sin embargo, los resultados obtenidos durante los experimentos de FST a 37°C descartan esta posibilidad.

Al ver que los resultados no eran los esperados, se disminuyó la temperatura a los 21°C descritos para el FST original. Sin embargo, esto obligó a hacer una evaluación de la acción del agua fría por sí misma sobre la neurotransmisión espontánea. Es decir, que se hicieron experimentos de habituación a los 21°C. La neofobia de los roedores obliga a una habituación para poder descartar el efecto de la temperatura al aplicar el FST (Misslin y Cigrang, 1986). De hecho, como se ha comentado anteriormente, la gran mayoría de modelos de estrés se basan en esta premisa neofóbica durante el desarrollo de sus bases de actuación (Russell, 1973; Blanchard y cols., 1974). En este sentido, el modelo de estrés leve crónico de Paul Willner (1987) se basó en el concepto de que la exposición repetida a diferentes factores estresantes (evitando la habituación y aclimatación por parte del animal), permitía obtener una activación sostenida de los sistemas de estrés en el cerebro y cuerpo. En esta tesis para conseguir esta habituación se han seguido los principios usados en los trabajos de Zhong y colaboradores (2019). Estos autores consiguieron la habituación manteniendo a los animales nadando durante un tiempo más prolongado, un total de 15 minutos. Aunque en esta tesis se han usado períodos menores (solo 6 minutos) para la habituación a la temperatura se marcaron varias temporizaciones en días separados y con distinta cantidad de agua. Por otro lado, se descartaron todos aquellos animales que dejaron de nadar, asumiendo que entraban en alguna forma de depresión. La FST ha sido validada como un modelo animal de depresión (Willner, 1984) y como tal, el comportamiento de inmovilidad que muestran

algunos sujetos es interpretado como un “desánimo conductual”. De todas formas, por definición, hay que tener en cuenta que cualquier modelo nunca puede ser exactamente una réplica del proceso modelado, sino que se trata de una especie de simplificación lo más ajustada posible del mismo. De hecho, para muchos autores el FST carece de validez en la evaluación de la depresión o el comportamiento depresivo, ya que, como describió en su momento el propio Porsolt (Porsolt y cols., 1977b) la respuesta de inmovilidad en el transcurso del test es simplemente una variable dependiente de la situación de la prueba en sí. Además de ser una prueba rápida, y, por lo tanto, no es lo suficientemente prolongada para relacionar signos y síntomas característicos de la patogénesis de la depresión (cuyo desarrollo normalmente se extiende durante semanas o incluso meses). La reacción de flotación e inmovilidad por parte del roedor podría ser interpretada como una muestra de desesperación consecuente con la impotencia frente a un estresor ineludible agudo. Recientemente, Molendijk y de Kloet (2019) realizaron un análisis detallado del FST con el objetivo de determinar si realmente se puede calificar la respuesta de flotación por inmovilidad como un comportamiento depresivo excluyente o más bien puede determinarse como una forma de expresión implícita en una estrategia de afrontamiento al tipo de estrés aplicado. Se ha propuesto que esa inmovilidad sea una forma de enfrentamiento ante el peligro donde se prima la conservación de energía hasta que se presente una oportunidad para poder escapar (Molendijk y de Kloet, 2015; Commons y cols., 2017). Sin embargo, como el objetivo de la presente tesis respecto a esta prueba fue crear una muestra homogénea de comportamiento a la hora de afrontar el factor estresante mediante FST, se decidió que todos aquellos animales que dejaran de nadar durante un período de tiempo superior a los 30 segundos fueran excluidos del tratamiento. Es decir que la posibilidad de depresión o impotencia queda descartada en este estudio.

Una vez determinado el corto y leve efecto de la temperatura del agua a 21°C, se aplicó el FST y se obtuvo un incremento importante en la neurotransmisión espontánea, que se normalizó prácticamente por completo al llegar al 7º día post-FST. Estos resultados confirman la validez de esta prueba como tipo de estrés agudo, pero, al no superar el 70% de incremento, resultaba insuficiente por sí solo, como factor destacable en la cronificación y/o mantenimiento del SDM.

Otra de las cuestiones importantes a debatir está en el procedimiento del registro electromiográfico. Con el propósito de conseguir valores del nivel de estrés que podía generar solamente el agua fría, y de esta forma usarlos como valores control, fue necesario realizar la electromiografía de la pata izquierda del animal justo después de las pruebas de habituación al frío, y previamente a la aplicación del FST.

Aunque sabemos que resulta importante focalizarse en estresores que minimicen la probabilidad de que se produzca una lesión física por parte del ratón que pueda influir en las vías de estrés mediante la activación de mecanismos nociceptivos o inflamatorios adyacentes, en este caso nos resultó imposible evitar que el roedor tuviera que nadar con la herida producida para el registro electromiográfico. Esto se repite en todos los factores estresantes analizados, ya que es importante determinar los valores control del mismo animal previamente a la aplicación del estrés, pero concretamente en este, en el que la implicación del movimiento del animal era necesaria para la correcta ejecución de la prueba, tiene una consecuencia más directa que el resto. Afortunadamente, los resultados electromiográficos obtenidos, siguen un patrón muy similar entre las distintas formas de estrés utilizadas (incluido este), y este motivo fue suficiente para demostrar la fiabilidad del procedimiento.

#### **5.6.- ESTRÉS POR PRIVACIÓN DE ALIMENTO Y AGUA.**

Los experimentos siguen la misma dinámica que la lograda con el estudio del factor estresante del FST manteniendo un incremento tanto en la frecuencia de los mEPPs como de las áreas que presentaban ruido de placa (con un pico de incremento parecido entre ambos, alrededor del 150-155%) y con valores control al llegar a los 7 días post-tratamiento, lo que sirve, por un lado, para justificar este estímulo como factor estresante agudo y, por otro lado, para incluirlo en el diseño de un patrón crónico de estrés junto a la inmovilización y a la natación forzada por la gran similitud que presentan en la evolución de sus cambios neuromusculares.

Alrededor de un 15% del tiempo que los ratones pasan despiertos y en movimiento, lo dedican a comer y beber, dividido en varios episodios de corta duración y con un trasfondo social y conductual alimentario marcado (Van de Weerd y cols., 1997). Este hecho denota no solamente una relevancia biológica en esta acción, sino también un papel muy importante en el comportamiento y en la dinámica del animal. Evidentemente esto convierte la falta de comida y bebida como una fuente plausible de estrés. Hay que intentar mantener el requisito de que los datos recabados reflejen solamente los cambios neuromusculares sin que estos se encuentren contaminados por otros eventos, como deshidratación u otras características metabólicas secundarias al hambre.

Los protocolos de privación de alimentos se usan rutinariamente con el objetivo de iniciar o mantener estados motivacionales que se requieren en un experimento en particular (Carlini y cols., 2008). Sin embargo, existe una limitada evidencia sobre

cuándo la privación de alimentos compromete el bienestar animal, y a menudo provocan cierta controversia entre los miembros del comité institucional de cuidado y uso de animales (IACUC) que se encargan de revisar su funcionamiento. Por ejemplo, Dietze y colaboradores (2016) resaltan la falta de experimentos para evaluar específicamente el impacto que pueden causar los protocolos actuales de privación de alimentos en animales con respecto al principio de las 3R descritos y formulado por Russell y Burch (1959) en su libro "The principle of humane experimental technique". Este principio (reemplazo, reducción y refinamiento), se ha vuelto cada vez más importante en el diseño y la realización de experimentos con animales (Baumans, 2004; Burden y cols., 2015). Si desglosamos el significado de cada "R", las alternativas de *reemplazo* hacen referencia a aquellos métodos que eviten o sustituyan el uso de animales, y en el caso que no sea posible, cambiarlo por animales con una menor percepción del dolor. Por otro lado, las alternativas de *reducción* aluden a cualquier estrategia que tenga como resultado el menor número usado de animales para obtener datos suficientes que respondan a la cuestión investigada, y en la situación de que el animal tenga que ser sacrificado, sacar el mayor provecho posible de este para poder limitar o evitar el uso posterior de otros animales con esa misma finalidad (y siempre intentando no comprometer el bienestar animal). Finalmente, las alternativas de *refinamiento*, que destacan la modificación y sustitución de la cría de animales, o de los procedimientos necesarios para minimizar el dolor y la angustia, y de esta manera asegurar el mejor bienestar posible de los sujetos utilizados experimentalmente, desde su nacimiento hasta su muerte.

Hay que tener en cuenta una serie de cuestiones en la evaluación de este tipo de protocolos. En primera instancia, es necesario determinar el grado de abstinencia a la que debe ser sometido el roedor. Además, es fundamental evaluar las posibles consecuencias adversas que el animal experimentará como resultado de esta privación. Finalmente, asegurar el bienestar de los animales, al mismo tiempo que permitir el cumplimiento exitoso de los objetivos del estudio.

De la misma forma que ocurría con el estrés por inmovilización, se puede establecer una distinción conceptual entre los términos de "restricción", y "privación" de alimentos. Restricción de alimentos implica una limitación de la ingesta *ad libitum* que se describe como la cantidad limitada de alimentos o agua que se proporciona diariamente o a la que tiene acceso el animal de experimentación. Por otro lado, la privación consiste en la negación total y absoluta de comida y/o agua, y se describe como el intervalo de duración durante la que se produce esta retención alimentaria. Aunque conceptualmente en muchos aspectos parece que puedan superponerse, la realidad es que no pueden usarse indistintamente ya que cada tipo produce efectos



distintos tanto físicamente como psicológicamente. Por ejemplo, en estudios donde se aplica la restricción, los animales tienen la oportunidad de comer y beber cada día, pero la cantidad de oportunidades de realizar esta acción se encuentra reducida o limitada notablemente (Toth y Gardiner, 2000). Algunos autores, como por ejemplo Corton y Brown-Borg (2005), proponen la restricción calórica como una perspectiva alternativa generadora de respuestas metabólicas homeostáticas adaptativas que pueden mejorar y promover la buena salud y la longevidad a largo plazo en diversas especies filogenéticamente distintas. En cambio, con la privación se generan una serie de reacciones metabólicas mucho más pronunciadas y, por lo tanto, que hay que tener en cuenta a la hora de aplicar este formato de estrés.

Por lo que se refiere a la evaluación del impacto de la abstinencia de agua en la salud y bienestar de un animal, hay que comprender los mecanismos fisiológicos que regulan la sed, la ingesta de líquido y la homeostasis hídrica. Los dos estímulos fisiológicos principales que provocan sed en condiciones normales son la deshidratación y la hipovolemia, y son claramente identificables. Cuando un animal se deshidrata, aumenta la concentración del líquido intersticial (debido a eso el gradiente osmótico extracelular extrae el agua de las células y se produce una disminución del volumen intracelular), y se reduce el volumen de líquido intravascular (sed hipovolémica). El grado de deshidratación desarrollado después de las 24 horas sin agua es muy variable en función de la especie (Toth y Gardiner, 2000). Así, por ejemplo, en roedores, que son particularmente eficientes en la gestión hídrica, los períodos de privación de 24 horas o menos no alteraban las cantidades de ingesta compensatoria en comparación a la de aquellos que sí disponían de agua, pero si el período de privación es más largo, sí que se producen aumentos sustanciales en este aumento de consumo (Dufort y Abrahamson, 1966). La disponibilidad restringida de agua por intervalos de hasta 24 horas, incluso dentro de un programa de restricción crónica mantenida en el tiempo, no causan deterioro fisiológico. Por ejemplo, un examen clínico diario y una evaluación integral orgánica postmortem no revelaron anomalías destacables en ratas (Hughes y cols., 1994). De hecho, la disponibilidad limitada del agua es un desafío homeostático común de manera que la mayoría de los animales presentan un sistema fisiológico plenamente adaptado para este tipo de situaciones, pero toda aquella restricción que supere las 24 horas se ha visto que puede terminar resultando en alteraciones que pueden influir a los datos obtenidos. En este sentido y a la vista de lo comentado anteriormente, el protocolo de deprivación de agua aplicado en la presente tesis es completamente adecuado y sin contaminaciones por complicaciones fisiológicas adaptativas. A diferencia de la deprivación hídrica, la evaluación de los efectos del hambre no cuenta con una

clasificación precisa, concisa y universalmente aceptada de los estímulos fisiológicos implicados en condiciones normales que definan una deficiencia metabólica. El bajo conocimiento de la regulación tanto del hambre como de la saciedad complica la apreciación del posible impacto que puede generar una privación de alimentos en animales (Friedman y Stricker, 1976). Sin embargo, de la misma forma que hemos visto con la sed, los animales tienen la capacidad de modificar con facilidad sus patrones de ingesta para adaptarse y acomodarse al acceso programado y/o limitado a los alimentos. Allaben y colaboradores (1996) para predecir esta necesidad, realizaron una estimación en función del peso corporal y la ingesta de alimentos y la compararon con los valores de referencia propios de un animal de la misma especie mediante controles. Gracias a este análisis individualizado, estos autores describieron determinadas dificultades como que el peso corporal de los roedores, aunque sean genéticamente idénticos, puede variar notablemente de unos respecto a otros. Otra dificultad adicional fue que la ingesta de alimentos, y, por lo tanto, las necesidades calóricas de los roedores varían según la edad, las condiciones de alojamiento, el estado fisiológico previo al experimento, la movilidad que tengan, o el medio ambiente y contexto que lo rodea, entre otras características, todo ello difícilmente estandarizable (Romano y cols., 2019). De todas formas, el ayuno prolongado en roedores, normalmente se termina acompañando de una pérdida de peso corporal, y evidentemente este parámetro es totalmente contrario al confort del animal, por lo que será importante evitar que nuestro protocolo pueda alterarse por este tipo de repercusión metabólica (Dietze y cols., 2016). Los períodos de privación de alimentos de 24 y 48 horas son los protocolos más utilizados, aunque se ha descrito que la abstención de comida durante un período de 48 horas puede conducir a una pérdida de peso corporal de hasta el 20% (Garlick y cols., 1973). Este volumen de pérdida de peso ya se comenta en las directrices establecidas por la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63/EU). En estas directrices se establece una clasificación de severidad de los procedimientos experimentales en animales de laboratorio, y mientras que la privación de alimentos de 24 horas en roedores se define como “leve”, durante un tiempo de 48 horas se define como “moderada”. Otro ejemplo lo encontramos en el estudio de Malatová y Ahlers (1977), donde examinaron y compararon el ritmo diario del nivel de corticosterona plasmática en ratas normoalimentadas, en ayuno de 24 y de 48 horas. Mientras que los parámetros metabólicos analizados presentaban cambios poco significativos en ayuno de 24 horas, después de la privación de 48 horas se encontraron cambios notables y alteraciones circadianas significativas. En este sentido, y a la vista de lo

comentado anteriormente, el protocolo de privación de alimento aplicado en la presente tesis es completamente adecuado y así se puede asumir que los resultados obtenidos son producto del estrés en estado puro.

Por otro lado, era importante determinar si la privación de alimentos está asociada con un aumento de estrés, tanto metabólico como psicológico. Cuando se somete a ratas a un período de 24 horas sin alimentos, se obtiene una activación simpática y elevaciones moderadas en los niveles plasmáticos de glucocorticoides (Malatová y Ahlers, 1977; Abrahamsen y cols., 1995). No obstante, la magnitud de este aumento es significativamente menor a los que se producen cuando los animales son sometidos a otros tipos de factores estresantes (Cure, 1989). Los glucocorticoides son unos buenos indicadores del estrés. Los glucocorticoides promueven la gluconeogénesis y reducen la utilización y el consumo de glucosa por los tejidos periféricos, con el objetivo de proteger a otros órganos más importantes que también son dependientes de glucosa para su correcto funcionamiento (como, por ejemplo, el cerebro). Además, un aumento de la activación simpática suscita una mejor utilización de esta glucosa. Cuando este aumento de actividad metabólica es controlado, no produce cambios significativos en la fisiología del roedor, pero como ya hemos visto, posterior a las 48 horas de privación alimentaria, estos niveles glucocorticoides aumentan notablemente y el ritmo circadiano se deteriora. Desviaciones que sugieren, de nuevo, que un período de ayuno superior a 24 horas se asocia con un aumento del estrés metabólico, y probablemente, con una exacerbación negativa del estrés psicológico del roedor.

El impacto psicológico, en este caso, es más complicado de evaluar en animales dado que ofrecen algunos datos relevantes para determinar este factor pero que no se pueden extrapolar al comportamiento humano. Por ejemplo, estudios realizados en humanos sugieren que la restricción alimentaria puede causar una simple "preocupación" por la comida y la alimentación, pero no necesariamente estrés físico o psíquico asociado (Shukitt-Hale y cols., 1997; Friedl y cols., 2000). De todas formas, es probable que los horarios de restricción de alimentos a largo plazo no permitan que el animal pueda comer hasta la saciedad, y con el tiempo, estos animales pueden experimentar cierto grado de hambre crónica inducida (Friedman y Stricker, 1976). Además, la restricción alimentaria severa o privación total durante varios días podría verse asociado con el desarrollo de úlceras gástricas en ratas, particularmente si se suma a otro factor estresante (Yi y Stephan, 1998).

En resumen, los períodos de más de 24 horas de privación de alimentos pueden resultar perjudiciales para el bienestar del animal tanto fisiológica como psicológicamente. Además, estas alteraciones pueden interponerse y alterar los

resultados obtenidos con la aplicación de este tipo de estrés. En cambio, después de 24 horas de ayuno, o con un grado moderado de restricción calórica, los animales tendrán hambre y podemos afirmar a partir del análisis del apartado correspondiente, que se producen cambios significativos en su actividad neuromuscular indicativos de que los animales sufren cierto grado de estrés psicológico, pero sin que eso altere su homeostasis metabólica ni su salud.

Insistir que, a la vista de lo comentado anteriormente, el protocolo de privación de alimento y agua aplicado en la presente tesis es completamente adecuado y así se puede asumir que los resultados obtenidos son producto del estrés en estado puro.

### **5.7.- ESTRÉS POR AISLAMIENTO SOCIAL.**

En el uso de la jaula metabólica coinciden varios factores estresantes ambientales conocidos en roedores. Aunque su uso principal es el alojamiento de animales en el laboratorio, se ha descrito que dicho entorno genera cambios en el comportamiento. Sin embargo, pocos estudios han abordado específicamente la naturaleza y la magnitud de este cambio. Por ejemplo, Whittaker y colaboradores (2016) refirieron que se produce un efecto cuantificable sobre el comportamiento espontáneo o provocado en roedores, con una tendencia inequívoca a la inactividad, conduciendo a un estado emocional negativo, lo que podría tener consecuencias negativas directas en su bienestar.

En la bibliografía existen varios estudios realizados en roedores (Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez, 1991; Gil y cols., 1999; Eriksson y cols., 2004) que, mediante el uso de varias pruebas conductuales y fisiológicas, han evaluado respuestas relacionadas con el estrés por el alojamiento en este tipo de jaulas. En general, el metabolismo se ve alterado por este tipo de restricciones, siempre que los animales son sometidos a esta situación durante largos plazos de tiempo. Por lo que se refiere a las respuestas de comportamiento, también pueden verse modificadas, aunque es más difícil establecerlo, ya que puede depender de la edad y también es probable que sea específico del tipo de prueba aplicada para evaluarlo (Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez, 1991; Gil y cols., 1999; Eriksson y cols., 2004).

Las jaulas metabólicas requieren del uso de pisos de rejilla, ausencia de sustrato de cama para que los roedores puedan hacer sus nidos de descanso ni elementos de enriquecimiento ambiental que aumenten la habitabilidad del espacio y

también aislamiento social, ya que su uso es individual, combinado con un espacio más pequeño que el de la jaula convencional (aproximadamente, un tercio menos de área habitable). Se ha demostrado en numerosos estudios que todos estos factores provocan respuestas negativas conductuales y fisiológicas en roedores (Manser y cols., 1995; Whittaker y cols., 2012; Ravanelle y cols., 2014). Por lo tanto, se supone que la combinación de todos estos factores, independientemente de la finalidad metabólica de la jaula, constituyan un estresor interesante para tener en cuenta.

Kalliokoski y colaboradores (2013), evaluando marcadores de estrés oxidativo agudo junto con signos clínicos concluyeron que los ratones no son capaces de adaptarse ni aclimatarse a este tipo de jaulas. La normativa vigente por el bienestar de los animales dictamina que el tiempo en la que estos animales deben alojarse en estos habitáculos tiene que ser el menor posible (ver Directiva 2010/63/EU comentada anteriormente). El elevado grado de actividad del eje HPA, la presencia de variaciones hormonales que confirman un estrés oxidativo elevado y el aumento del metabolismo general durante las 3 semanas que duró el estudio de Kalliokoski, justifican la necesidad de precaución al interpretar los datos obtenidos en este período de tiempo ya que su condición no puede considerarse representativa de una fisiología normal. Este fue uno de los motivos principales por los que en la presente tesis se inició este tipo de experimentos con un tiempo lo suficientemente largo como para poder generar cambios neuromusculares, pero al mismo tiempo lo suficientemente corto para que no tuviera la capacidad de generar estos cambios oxidativos negativos comentados.

De acuerdo con lo establecido por la directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010, relativo a la protección de los animales utilizados para fines científicos, el uso de la jaula metabólica durante un período superior a 24 horas debe clasificarse como un procedimiento de gravedad moderada con respecto al dolor, sufrimiento y/o angustia, y el confinamiento en esta estructura superior a los 5 días, recibe una clasificación severa (Directiva 2010/63/EU). Es precisamente por eso, que se inició esta fase experimental con 24 horas de actuación. Además, este corto período de tiempo no provoca los resultados indeseables que un largo plazo puede causar, como ansiedad o depresión (Sahin y cols., 2019). Sin embargo, no se obtuvieron resultados suficientes y se optó por prolongar durante 5 días en la jaula a algunos animales, con el objetivo de observar si se producía un posible efecto adaptativo que pudiera influenciar en los resultados, o realmente se mantenía la habituación que ya observamos durante el uso de la inmovilización.

Con esta metodología los resultados obtenidos están en concordancia con lo que previamente se ha publicado (Whittaker y cols., 2012; Ravanelle y cols., 2014). La

neurotransmisión espontánea se incrementó inmediatamente después de la aplicación del estresor, alcanzando un máximo a las 48h y normalizándose paulativamente hasta los 7 días después del tratamiento.

Hay que tener en cuenta que en este tipo de estrés existe la presencia de más de un factor estresante acumulado en la misma metodología. El aislamiento social, combinado con la inmovilización relativa, y la limitación de recursos básicos, como la comida y el agua, pueden resultar una combinación de factores asociados al uso de la jaula metabólica (Whittaker y cols., 2012; Ravanella y cols., 2014) difícilmente controlables y, a la vez, resultar como un elemento añadido que incrementa los cambios neuromusculares detectados en comparación con los factores homónimos presentes en los distintos tipos de estrés agudos estudiados aisladamente. De todas formas, los cambios obtenidos en esta tesis no fueron lo suficientemente importantes como para modificar la línea de trabajo y se confirmó que la jaula metabólica sigue la misma línea que los estresores analizados anteriormente. Además, nuevamente se determinó que el uso de un único estresor agudo resultaba insuficiente para que los cambios electrofisiológicos fueran compatibles con la generación de un PGM.

En ratones introducidos en estas jaulas está descrito que la ingesta de agua y alimentos, la micción y el peso corporal no parecen estabilizarse hasta aproximadamente 4 días después de la aclimatación a este nuevo espacio (Stechman y cols., 2010). La estabilización de estos parámetros se puede interpretar como una habituación del animal al entorno y de esta forma los cambios observados sólo corresponderían a la actividad neuromuscular, y no se encontrarían asociados a posibles cambios metabólicos. Aprovechando que el uso de la jaula metabólica requiere de una baja demanda física muy parecida a la generada mediante el estrés por inmovilización sumado a la natural inclinación de estos animales hacia la inactividad por la restricción de movimiento y por la incomodidad del espacio en sí y partiendo de la premisa que el uso de la inmovilización también se aplicó durante 5 días consecutivos, se propuso seguir la misma pauta y mantener al animal un total de 5 días confinado en la jaula metabólica para determinar si posteriormente a su utilización, el roedor presentaba síntomas de habituación, o bien rompía con los patrones establecidos hasta el momento y se producía una cronicidad en el incremento de la actividad mantenida en el tiempo, mediante un aumento en la potencia de los resultados obtenidos. Durante este aislamiento social prolongado se obtuvo un incremento significativo de la neurotransmisión espontánea muy parecido al encontrado mediante una única intervención durante 24 horas, pero con la diferencia que se obtenían los primeros resultados en momentos diferentes. Mientras que en el uso de la jaula metabólica 24 horas los primeros cambios se obtuvieron a partir de las

48 horas posteriores, en los experimentos con 5 días consecutivos en la jaula metabólica se obtuvieron los primeros resultados a las 24 horas post-tratamiento. Esto es indicativo de la potencia de este tipo de estrés. Seguramente por este motivo, este incremento no se terminó de normalizar por completo en ninguno de los tiempos estudiados. La disminución tardía obtenida en la neurotransmisión espontánea podría justificarse por una relativa habituación del animal a la jaula metabólica (Stechman y cols., 2010). Este hecho confirma la idea ya planteada en algunos estudios de que si la exposición diaria se genera alrededor de un mismo tipo de estrés, sin combinar estímulos nuevos, se reducen las posibilidades de generar cambios significativos que se puedan mantener a largo plazo (Martí y Armario, 1998; Armario y cols., 2008). Además, reafirma la necesidad de seguir analizando tipos de estrés agudo distintos entre ellos que permitan conformar una cronicidad en el incremento de la actividad neuromuscular.

## **5.8.- ESTRÉS POR ULTRASONIDOS.**

El aparato auditivo del ratón (de la misma forma que la fonación) ha evolucionado hasta poder escuchar y emitir frecuencias mucho más altas de las perceptibles por el mismo aparato en humanos (Sewell, 1970). Concretamente, su rango auditivo está desde 5-20 kHz y 50 kHz (Baumans y cols., 2010), mientras que el rango auditivo humano se mantiene entre 20 Hz hasta un máximo de 20 kHz. Los ratones, solamente emiten vocalizaciones ultrasónicas en 2 contextos sociales. Las más habituales, producidas por los cachorros, correspondientes a llamadas de atención en situaciones de falta de cuidado o en por frío (<10 kHz), o llamadas de socorro cuando las separan de sus madres (50–70 kHz) (Uematsu y cols., 2007). En la edad adulta, las señales emitidas por los ratones macho adultos cuando se encuentran con hembras o cuando son estimulados mediante feromonas femeninas ( $\approx$  70 kHz) (Nyby y cols., 1977). Otros estudios, han demostrado que estas emisiones ultrasónicas de los ratones macho tienen características de comportamiento similares a las canciones de las aves, incluyendo toques silábicos con secuenciación temporal, frases repetidas y variabilidad entre individuos (Holy y Guo, 2005). En resumen, los roedores precisan de forma habitual y vital de los ultrasonidos.

Algunos de los ruidos habituales de los bioterios pueden ser una fuente de estrés para estos animales, sobre todo si la exposición al ruido, aunque sea de intensidad moderada, es relativamente larga. Así, por ejemplo, Cheng y su equipo (2011) evidenciaron efectos negativos progresivos en el aprendizaje y la memoria de

los ratones cuando se sometían a esta contaminación acústica mantenida y aplicada en distintas fases. Es decir, la exposición crónica a un estímulo ultrasónico de impacto emocional variable resulta ser un procedimiento potente de estrés en roedores (Litvin y cols., 2007). Recientemente, y siguiendo esta línea, Pavlov y colaboradores (2019) demostraron justamente que una exposición de 3 semanas a frecuencias alternas ultrasónicas impredecibles, dentro de un rango de 20-25 kHz y 25-45 kHz, pueden inducir características similares a la depresión en murinos de laboratorio (ver también Morozova y cols., 2016). Teniendo en cuenta que la mayoría de los modelos utilizados en esta forma de estrés están orientados a provocar depresión en los animales, en esta tesis se planteó crear un protocolo que provoque estrés agudo, y que pudiera resultar comparable con las otras formas de estrés aplicadas.

Como se ha comentado, tanto las ratas como los ratones muestran una gran sensibilidad emocional a los sonidos producidos en determinados rangos de frecuencia, y concretamente, se sabe que los roedores emiten los sonidos alrededor de un rango de 20-25 kHz en situaciones extremas, como la derrota social o en presencia de dolor, aversión o miedo ineludible (Portfors, 2007). Por ese motivo, en la presente tesis se ha optado por emplear una exposición a una frecuencia alterna impredecible de entre 20-25 kHz que corresponde a una vocalización referente a un “estado emocional negativo” (Kuraoka y cols., 2010).

Para determinar los tiempos de exposición, en la bibliografía se encuentran períodos prolongados, por ejemplo 3 semanas, con la intención de evaluar las posibles fuentes de estrés oxidativo asociados a la ansiedad y a la depresión (Costa-Nunes y cols., 2020). Para evitar esas situaciones, inicialmente se planteó usar una periodicidad corta, con una exposición ultrasónica de 3 horas. Sin embargo, los resultados obtenidos tanto en el registro intracelular como en el registro electromiográfico, no muestran cambios importantes más allá de las primeras 24 horas, y con una reversión a valores control a partir de las 48 horas posteriores a la exposición al factor estresante. Por lo que se aumentó el período de exposición al ultrasonido hasta las 24 horas. Como se ha comentado anteriormente, este período de tiempo está justificado que puede ser estresor sin efectos indeseables. En este caso, sí que se obtuvo un aumento de la neurotransmisión espontánea claramente visible a partir de las primeras 24 horas post-tratamiento que se mantuvo elevado a las 48 horas, pero que, al igual que había sucedido en el análisis de los otros factores estresantes, fue decreciendo hasta llegar a valores control al 7º día.

En resumen, con el uso del ultrasonido durante 24 horas, se consigue la quinta forma de estrés. Todas ellas presentan una evolución muy similar respecto a la neurotransmisión espontánea.



## 5.9.- BÚSQUEDA DEL ESTRÉS CRÓNICO IDÓNEO.

Mientras que el estrés agudo favorece la adaptación y sirve como protector biológico, el estrés crónico es maladaptativo y termina causando daños, tanto a nivel central como periférico (McEwen, 2007). Esto explicaría, en parte, el motivo por el que ninguno de los estresores, analizados de forma aislada, son suficientes para mantener cambios funcionales el suficiente tiempo como para convertirlos en candidatos de colaborar de forma directa en la generación o mantenimiento del SDM.

En el ámbito de la investigación preclínica, se han desarrollado varios paradigmas para investigar los efectos del estrés crónico de los roedores en laboratorio. Hace ya muchos años, Hans Seyle (1952) desarrolló su famosa teoría acerca de la influencia del estrés sobre la capacidad de afrontar o adaptarse a las consecuencias patológicas o lesionales. Seyle estableció, bajo el nombre de "Síndrome de Adaptación General" (*General Adaptation Syndrome, GAS*), que la respuesta al estrés se incrementará independientemente del estímulo provocador. Según este autor, la teoría se distribuye en 3 etapas bien definidas. Una primera fase de alarma, en la que el organismo, ante la percepción de una posible situación de estrés empieza a desarrollar un cúmulo de alteraciones a nivel tanto fisiológico como psicológico. Una segunda fase de adaptación y resistencia, en la que el conjunto de procesos comportamentales, fisiológicos, cognitivos y emocionales desarrollados en la fase anterior se reorganizan para afrontar esta situación de estrés y limitar así sus efectos patológicos. Y finalmente una fase final de agotamiento, que sólo se inicia en caso de fracaso de los elementos adaptativos comentados, y en la que predominan los trastornos fisiológicos, psicológicos y psicosociales con clara tendencia a la cronicidad. Para desarrollar la presente tesis de la forma más eficaz posible, fue trascendental llegar a esta última fase. Para ello hay que tener en cuenta factores como los parámetros físicos del estímulo ambiental del propio estrés aplicado (por ejemplo, la intensidad o la frecuencia de un ruido), las características específicas del animal estresado, el grado de amenaza percibido, la interacción del estrés con otros estímulos ambientales asociados que puedan influir sobre la situación, o el grado de control sobre el estímulo de estrés aplicado (Anisman y Merali, 1999).

Uno de los primeros modelos a estudiar fue el de estrés crónico leve (*Chronic Mild Stress o CMS*) consistente en una exposición intermitente a diversos factores estresantes imprevisibles. Este paradigma desarrollado por Willner y colaboradores (1962) permite evitar la adaptación y la previsibilidad de una exposición repetida a la misma, y para ello, utiliza una gran variedad de estresores físicos, como el frío, la privación de alimentos o cambios en el ciclo de la luz con una variación diaria del

estímulo estresante. Este programa, aunque fue validado para generar depresión y aumentar el comportamiento relacionado con la ansiedad y anodinia de los ratones, se ha denunciado en ocasiones debido a su falta de eficacia, e incluso por los efectos ansiolíticos y la controversia que genera en sus resultados experimentales (Schweizer y cols., 2009).

Posteriormente, el propio Willner (Willner y cols., 1987) desarrolló el “modelo de estrés moderado”, basado en el hecho de que la exposición repetida a diferentes agentes estresantes acaba resultando en una activación sostenida de los sistemas de estrés, tanto en el cerebro como en el resto del cuerpo, siempre evitando, evidentemente, la habituación y la aclimatación por parte del animal. La idea que la exposición al estrés crónico puede ser un motivo causal en la evolución de trastornos afectivos y se apoya en los hallazgos de la función alterada y notablemente aumentada de la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal y sistema S-Adenosilmetionina, y en el aumento de los niveles de la hormona liberadora de la hormona corticotropa (CRH) en pacientes que presentan depresión (Nemeroff y cols., 1984). Estos mismos aspectos se cumplen en pacientes con PGM (Yoshihara y cols., 2005), hecho que debería de ser suficiente para que estos cambios autonómicos justificaran, en parte, las posibles alteraciones a nivel neuromuscular que puede sufrir el animal.

El conflicto con la presente tesis es que estos modelos preclínicos se presentan como un modelo de depresión bien por una disminución del consumo de sacarosa como una forma de desarrollo de anhedonia, como por su reversibilidad mediante la administración de antidepresivos convencionales, lo que limita los parámetros analizados y la metodología utilizada (Schmidt y cols., 2007). Además, gran parte de la variabilidad de resultados en estos modelos puede ser debida a la manca de estandarización en la forma de su aplicación, combinando distintos tiempos, o con el uso de diferentes estresores, entre otros aspectos.

También hay que tener en cuenta el hecho de usar esta adaptación del modelo para probar la capacidad de resiliencia o susceptibilidad por parte de los ratones, estratificando aquellos que son vulnerables a sufrir cualquier síntoma relacionado con un proceso depresivo respecto a los que consiguen superar la implantación del estrés sin este tipo de consecuencias durante su transcurso (Bergström y cols., 2008). Estudios como los desarrollados por Schmidt y colaboradores (2007) aprovechan para induir inestabilidad social a través de un protocolo específico de estrés social crónico (*Chronic Social Stress* o CSS) y aunque éste demostró cambios en el comportamiento y cambios relacionados con la ansiedad o la depresión, no se pudo determinar si realmente estas respuestas eran patológicas o podían ser un fenómeno adaptativo por

parte del animal para afrontar y sobrevivir en un entorno potencialmente amenazador, y que terminara seguidamente con una habituación.

La mayoría de las enfermedades y patologías relacionadas con el estrés crónico, como la depresión o la ansiedad, se caracterizan por la presencia de niveles elevados de glucocorticoides. Hay una estrecha conexión de estas hormonas con la respuesta de adaptación al estrés por lo que gran parte de los estudios se han basado en paradigmas donde se aplican estresores físicos relacionados con la inmovilización (Sapolsky y Meaney, 2000; Dal-Zotto y cols., 2003). No obstante, la duración total del estrés por restricción de movilidad presenta muchas variaciones en función del experimento realizado. El principal motivo de esta heterogeneidad metodológica se encuentra en la actual ambigüedad existente en el concepto de estrés crónico, particularmente en los modelos animales estudiados. Estudios como los realizados por Kim y Han (2006) han utilizado rasgos y características típicas de la conducta animal como parámetros de evaluación del estrés, y sus resultados muestran que estos criterios psiquiátricos cumplen los suficientes requisitos para poder ser utilizados como prototipo de paradigma en estudios relacionados con el estrés crónico en animales. Con todo, en ninguno de estos estudios se evalúa la actividad neuromuscular ni la influencia del estrés en estos cambios de actividad.

Por otro lado, los parámetros usados durante los procesos metodológicos para la generación del estrés son habitualmente muy prolongados. Por ejemplo, en el estudio comentado anteriormente de Kim y Han, se demostró que el tratamiento de contención de 2 horas diarias durante 14 días era suficiente para inducir comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión (Kim y Han, 2006). Sin embargo, en la presente tesis se han obtenido cambios electrofisiológicos y electromiográficos en un período de tiempo mucho más corto.

La mayoría de los procedimientos publicados que se realizan para conseguir un estrés crónico son a muy largo plazo, con períodos de incluso varias semanas. Esto es así dado que se buscan condiciones patológicas identificadas mediante cambios en parámetros a nivel fisiológico y central (peso corporal, afección de la piel, medidores de estrés cerebrales, peso suprarrenal, entre otros; Strekalova y cols., 2004; Schmidt y cols., 2007). En la presente tesis, como el objetivo era distinto, antes de iniciar la búsqueda de un estrés crónico fue necesario asegurar que este podía ser fruto de la combinación de diferentes agentes estresores agudos y estudiarlos de forma individual para asegurar que eran viables y acordes con el objetivo de la tesis de incrementar la actividad neuromuscular e intentar generar cambios morfológicos identificables a nivel microscópico.

En las condiciones habituales de los laboratorios de experimentación animal, el estrés se puede provocar fácilmente de numerosas formas. Sin embargo, estos modelos de estrés se encuentran fácilmente asociados a situaciones, como la habituación, o la sensibilización por parte del animal, que pueden llegar a generar dudas respecto la calidad de los resultados y la validez de las conclusiones experimentales (Patchev, 2006). También hay que tener en cuenta el cumplimiento de una serie de precauciones generales que ayudan a garantizar la reproducibilidad de los experimentos. Varios estudios sugieren que hay un trasfondo genético que puede aumentar la vulnerabilidad del animal a la hora de afrontar retos ambientales, como, por ejemplo, la exposición a la novedad (Boleij y cols., 2012). Estos hallazgos obligan a considerar directrices y protocolos específicos de la cepa utilizada para tener en cuenta sus capacidades adaptativas específicas para no generar sesgos en los resultados obtenidos. Todos estos factores han sido considerados en la presente tesis (ver el apartado “Animales de *Material y métodos*”).

#### **5.10.- ESTRÉS CRÓNICO POR COMBINACIÓN DE ESTRESORES.**

Actualmente, uno de los mayores obstáculos que encontramos en la investigación preclínica experimental del SDM es el de provocar cambios relevantes y que se mantengan en el tiempo. En el laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Rovira i Virgili se determinó un modelo de PGM en ratón que, después de una sola inyección de neostigmina subcutánea, la frecuencia de los mEPPs se mantuvo muy elevada, el mayor incremento que se ha obtenido en ninguna situación experimental hasta el momento (~300% de incremento), pero solamente el primer día posterior al tratamiento, y aproximadamente a las 48 horas, los valores correspondientes al número de eventos espontáneos presentes durante el registro se normalizaban (Margalef y cols., 2019). De hecho, el cómputo global de todos los parámetros alterados durante la aplicación de este modelo animal no dura más de 3 días. Es probable que el incremento en la liberación espontánea de ACh no sea un factor suficiente para alargar la presencia de PGMs, que habitualmente es de más de una semana, y esta situación podría estar relacionada con la ausencia de la intervención de factores perpetuantes asociados, como podría ser el estrés.

Con el objetivo de mantener este aumento de ACh, la última parte del trabajo consistió en combinar los distintos protocolos de estrés agudo, de manera que el animal no pudiera habituarse y así mantener el estrés, de manera más prolongada y eficaz.

Se ha comprobado que un aumento de ACh en la hendidura sináptica provoca una potenciación retrógrada en la secreción de más ACh (Santafé y cols., 2006; Santafé y cols., 2015). Es decir, si se consigue mantener un flujo constante de ACh, los cambios neuromusculares registrados podran mantenerse durante un período más largo de tiempo. Por ese motivo se pretendió crear una situación en que pueda existir estrés prolongado. Así que los distintos factores estresantes agudos fueron seleccionados de manera aleatoria y continuada, pero que evitaran cualquier intento de adaptación. Se ha comentado anteriormente que la exposición impredecible a este tipo de factores induce estrés en ratones (Monteiro y cols., 2015). El hecho de privar de alimento durante 24 horas antes de una prueba de FST puede resultar un condicionante importante en los patrones de inmovilidad, y, por lo tanto, en la respuesta conductual del roedor (Jefferys y Funder, 1991); así que estos dos factores estresantes no pueden ser consecutivos. Por otro lado, también era necesario que los tiempos de recuperación marcados entre las distintas aplicaciones de estrés se cumplieran para que no se pudiera producir ningún tipo de interacción endocrina y/o metabólica que pudiera contaminar indebidamente los resultados finales.

Además, entre estresor y estresor, fue necesario aplicar 24 horas de descanso para que el animal se recuperase, a veces incluso físicamente, para poder afrontar un nuevo estresor. Ya se ha comentado, por ejemplo, que la privación de comida durante un período de 48 horas puede producir una pérdida de peso en el ratón (Garlick y cols., 1973). Obviamente no se puede extrapolar esta situación a esta combinación de estresores, ya que la etiología de cada uno de ellos es distinta, pero se valoró evitar una acumulación rápida de los factores que pudiera colaborar en la aparición de alteraciones oxidativas que pudieran influenciar directamente o indirectamente en el experimento, o que, además pudieran contravenir a las normas establecidas por la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63/EU).

Se valoró que la prueba de natación forzada adaptada tuviera que ser el último estresor aplicado. Por un lado, porque la conducta de inmovilidad permite asumir si el ratón está presentando señales depresivas, indicativo de que hay que descartar este animal (Porsolt y cols., 1977b; Hawkins y cols., 1978). Por otro lado, porque fue la prueba que presentaba más cambios en los tiempos post-exposición, debido al proceso de habituación a la temperatura del FST de 21°C. De esta forma, al ponerla en la fase final del estrés combinado, estos tiempos no interferían con las 24 horas de recuperación existente entre cada fase.

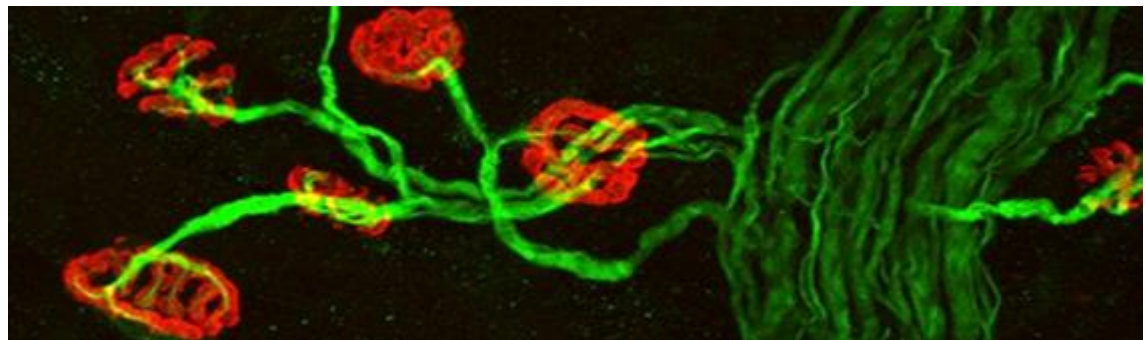
Con esta combinatoria de estresores, la neurotransmisión espontánea incrementó de forma significativa inmediatamente post-tratamiento, igual o más potente que los resultados obtenidos en el pico máximo de los estresores aislados. Concretamente con el registro intracelular, este incremento se mantuvo mucho más alto que ninguna otra situación estresora experimental estudiada hasta el momento en el transcurso de esta tesis (~200% de incremento), tanto a partir de los 3 días, como a los 7 días post-estrés y permaneció elevado hasta los 15 días posteriores a su aplicación.

De hecho, de todos los experimentos realizados hasta el momento en el laboratorio, estos resultados obtenidos en LAL solo se encuentran superados mediante la inyección de neostigmina, aunque en este caso los valores elevados ya volvían a la normalidad a los 3 días (Margalef y cols., 2019). En cambio, en este estudio, encontramos el clímax a los 7 días posteriores, y aunque a los 15 días observamos una disminución, se mantiene un incremento significativo superior al 60%. Por otro lado, mediante la implementación de dietas ricas en grasas durante un mes se obtuvo un incremento en la neurotransmisión espontánea que se mantuvo elevado hasta 3 semanas posteriores a la intervención (Gimenez-Donoso y cols., 2020). En cambio, con el estrés inducido, podemos afirmar que el aumento en los cambios neuromusculares obtenidos no es debido a posibles alteraciones metabólicas y/o oxidativas asociadas, sino simplemente como respuesta a la combinación psicofísica aplicada, hecho que potencia aún más la trascendencia de que se consiga mantener elevado durante un tiempo tan prolongado.

Todo esto, supone un paso importante en el estudio del SDM proponiendo el estrés como factor desencadenante/perpetuador con datos objetivos. Ya hemos comentado anteriormente que, hasta la actualidad, se especula que todo aquello que aumente la neurotransmisión puede participar en originar y/o mantener los PGM. En resumen se puede afirmar que el estrés crónico, influye de forma clara en el aumento de la neurotransmisión espontánea, y aunque los cambios electrofisiológicos analizados lo respaldan como una de las posibles fuentes que rodean la génesis, el desarrollo y/o la perpetuación del SDM, consiguiendo una actividad neuromuscular aumentada hasta los 15 días posteriores a su utilización, la falta de imágenes histológicas que contribuyan en su determinación morfológica, hacen suponer que, por sí solo, no tenga la suficiente potencia para establecerse como generador de PGM, y requiere de la participación de otros factores asociados para llegar a este desenlace. De todas formas, los resultados finales obtenidos en esta tesis parecen avalar la hipótesis integrada respecto a posibles mecanismos indicadores de la disfunción sináptica.



## 6.- CONCLUSIONES



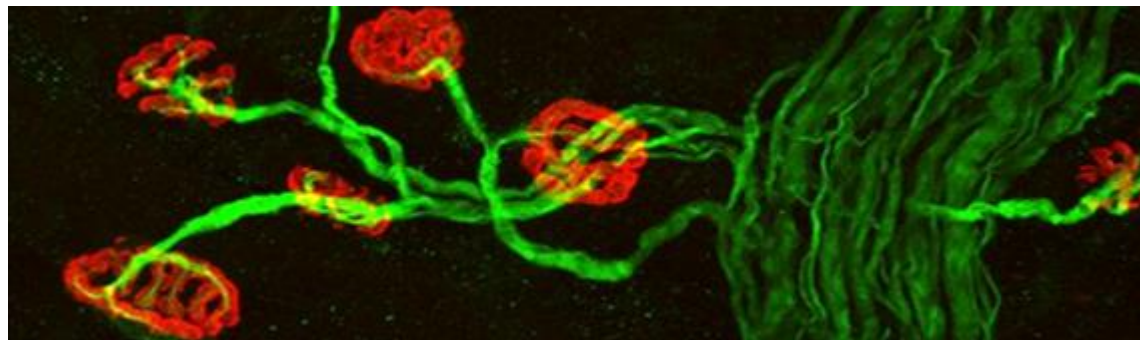




- 1.- El estrés agudo incrementa la neurotransmisión espontánea en cada uno de los tipos analizados: inmovilización, FST, privación de alimento y agua, aislamiento social y ultrasonidos.
  - 1.1. Se ha detectado un fenómeno de habituación a algunos estresores de manera que los ratones son capaces de predecir al estresor y, por tanto, no se obtiene incremento en la neurotransmisión espontánea.
  - 1.2. Una vez sorteados los fenómenos de habituación individuales, todos los estresores agudos presentan una dinámica similar: incremento tardío en la neurotransmisión espontánea (24-48 horas) que se mantiene un máximo de 5 días y con retorno a la normalidad en a los 7 días.
- 2.- Se ha creado una secuenciación razonable de estresores agudos que evitan la habituación y generan una situación de estrés mantenido considerado como modelo animal de estrés crónico.
- 3.- El estrés crónico generado por la exposición a estresores secuenciales combinados incrementa la neurotransmisión espontánea de una manera diferente a la provocada por cada uno de los estresores individualmente.
  - 3.1. Los valores de neurotransmisión espontánea son más elevados en el modelo de estrés crónico que en ninguno de los estresores individuales que lo conforman.
  - 3.2. El incremento en la neurotransmisión espontánea fue inmediato y se mantuvo sobre 15 días.
  - 3.3. Los valores de neurotransmisión espontánea en el modelo de estrés crónico son los más elevados referenciados mediante una situación no farmacológica.
- 4.- En ningún caso hubo variaciones en la amplitud de los mEPPs indicando que ninguna forma de estrés alteraba la fisiología postsináptica.
- 5.- Ninguno de los factores estresantes estudiados, agudos o crónico, son capaces de crear nodos de contracción.
  - 5.1. Se propone que un valor superior al 200% de incremento de la neurotransmisión espontánea puede ser capaz de generar nodos de contracción.

El estrés crónico, generado a partir de la sumación de los factores estresantes agudos, genera un incremento de la neurotransmisión espontánea, que se perpetúa durante varias semanas reforzando su papel transcendental en la creación y/o perpetuación de los PGM. Sin embargo, al no obtener imágenes de nodos de contracción, se considera que no tiene la suficiente potencia para establecerse como generador de PGM por sí solo y que requiere de la participación de otros factores generadores.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA.





## A

- Abrahamsen GC, Berman Y, Carr KD. Curve-shift analysis of self-stimulation in food-restricted rats: relationship between daily meal, plasma corticosterone and reward sensitization. *Brain Res.* 1995; 695(2): 186-94.
- Ahern DK, Follick MJ, Council JR, Laser- Wolston N, Litchman H. Comparison of lumbar paravertebral EMG patterns in chronic low back pain patients and non-patient controls. *Pain.* 1988; 34(2): 153-60.
- Alford EK, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR. Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp Neurol.* 1987; 96(3): 635-649.
- Allaben WT, Turturro A, Leakey JE, Seng JE, Hart RW. FDA points-to-consider documents: the need for dietary control for the reduction of experimental variability within animal assays and the use of dietary restriction to achieve dietary control. *Toxicol Pathol.* 1996; 24(6): 776-81.
- Alvarez P, Green PG, Levine JD. Stress in the Adult Rat Exacerbates Muscle Pain Induce by Early-Life Stress. *Biol Psychiatry.* 2013; 74(9): 688-95.
- 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.* 1987; 82(1):83-8.
- Anisman H, Merali Z. Understanding stress: Characteristics and caveats. *Alcohol Res Health.* 1999; 23(4): 241-249.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol.* 1999; 160(1): 1-12.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour.* 1973; 21(2): 205-235.

Arendt-Nielsen L, Sluka KA, Nie HL. Experimental muscle pain impairs descending inhibition. *Pain*. 2008; 140(3): 465-71.

Armario A, Escorihuela RM, Nadal R. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32(6): 1121-35.

Ashton-Miller JA, McGlashen KM, Herzenberg JE, Stohler CS. Cervical muscle myoelectric response to acute experimental sternocleidomastoid pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990; 15(10): 10006-12.

## B

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): 1331-40.

Barnum CJ, Blandino Jr P, Deak T. Adaptation in the corticosterone and hyperthermic responses to stress following repeated stressor exposure. *J Neuroendocrinol*. 2007; 19(8): 632-42.

Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma?. *Gene Ther*. 2004; 11 Suppl 1: S64-6.

Baumans V, Van Loo PLP, Pham TM. Standardisation of environmental enrichment for laboratory mice and rats: Utilisation, practicality and variation in experimental results. *Scand J Lab Anim Sci*. 2010; 37(2): 101-114.

Bengtsson A, Bengtsson M. Regional sympathetic blockade in primary fibromyalgia. *Pain*. 1988; 33(2): 161-7.

Bergström A, Jayatissa MN, Mork A, Wiborg O. Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; An in situ hybridization study. *Brain Res*. 2008; 1196: 41-52.

- Blanchard RJ, Kelley MJ, Blanchard DC. Defensive reactions and exploratory behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1974; 87(6): 1129-1133.
- Blasberg B, Chalmers A. Temporomandibular pain and dysfunction síndrome associated with generalized musculoskeletal pain: a retrospective study. *J Rheumatol Suppl*. 1989; 19: 87-90.
- Boleij H, Salomons AR, van Sprundel M, Arndt SS, Ohl F. Not all mice are equal: welfare implications of behavioural habituation profiles in four 129 mouse substrains. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42544.
- Boleij H, Willems J, Leijten M, van't Klooster J, Lesscher H, Kirchhoff S, Lavrijsen M, Arndt SS, Ohl F. Chronic social stress does not affect behavioural habituation in male CD1 mice. *Behav Brain Res*. 2014; 273: 34-44.
- Bongers PM, de Winter CR, Kompier MA, Hildebrandt VH. Psychosocial factors at work and musculoskeletal disease. *Scand J Work Environ Health*. 1993; 19(5): 297-312.
- Borsini F. Models for depression in drug screening and preclinical studies: future directions. *World of J Pharmacol*. 2012; 1(1): 21-29.
- Brodal P. A neurobiologist's attempt to understand persistent pain. *Scand J Pain*. 2017; 15: 140-147.
- Bron C, Franssen J, Wensing M, Oostendorp RA. Interrater reliability of palpation of myofascial trigger points in three shoulder muscles. *J Man Manip Ther*. 2007; 15(4): 203-215.
- Brown WF, Varkey GP. The origin of spontaneous electrical activity at the end-plate zone. *Ann Neurol*. 1981; 10(6): 557-60.
- Buchthal F, Rosenfalck P. Spontaneous electrical activity of human muscle. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1966; 20(4): 321-36.
- Burden S. Development of the neuromuscular in the chick embryo: the number, distribution and stability of acetylcholine receptors. *Dev Biol*. 1977; 57(2): 317-29.



Burden N, Chapman K, Sewell F, Robinson V. Pioneering better science through the 3Rs: an introduction to the national centre for the replacement, refinement and reduction of animals in research (NC3Rs). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015; 54(2): 198-208.

## C

Carlini VP, Martini AC, Schiöth HB, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M, de Barioglio SR. Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration. *Neuroscience.* 2008; 153(4): 929-34.

Carlson CG, Kriebel ME. Neostigmine increases the size of subunits composing the quantum of transmitter release at mouse neuromuscular junction. *J Physiol.* 1985; 367: 489-502.

Chapman SL. A review and clinical perspective on the use of EMG and thermal biofeedback for chronic headaches. *Pain.* 1986; 27(1): 1-43.

Chen JT, Chen SM, Kuan TS, Chung KC, Hong CZ. Phentolamine effect on the spontaneous electrical activity of active loci in a myofascial trigger spot of rabbit skeletal muscle. *Arch Phys Med Rehabil.* 1998; 79(7): 790-4.

Chen Q, Bensamoun S, Basford JR, Thompson JM, An KN. Identification and quantification of myofascial taut bands with magnetic resonance elastography. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007; 88(12): 1658-61.

Cheng L, Wang SH, Chen QC, Liao XM. Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiol Behav.* 2011; 104(5): 981-8.

Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA.* 1992; 267(9): 1244-52.

Cobb CR, deVries HA, Urban RT, Luekens CA, Bagg RJ. Electrical activity in muscle pain. *Am J Phys Med.* 1975; 54(2): 80-7.

Colquhoun D, Sakmann B. Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol.* 1985; 369: 501-57.

Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The rodent forced swim test measures stress-coping strategy. Not depression-like behavior. *ACS Chem Neurosci.* 2017; 8(5): 955-960.

Corton JC, Brown-Borg HM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 in caloric restriction and other models of longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005; 60(12): 1494-509.

Couppé C, Midttun A, Hilden J, Jørgensen U, Oxholm P, Fuglsang – Frederiksen A. Spontaneous needle electromyographic activity in myofascial trigger points in the infraspinatus muscle. *J Musculoskelet Pain.* 2001; 9(3): 7-17.

Crossley E, Biggs T, Brown P, Singh T. The accuracy of iphone applications to monitor environmental noise levels. *Laryngoscope.* 2020. 131; 1: 59-62.

Cure M. Plasma corticosterone response in continuous versus discontinuous chronic heat exposure in rat. *Physiol Behav.* 1989; 45(6): 1117-22.

## D

Dahlström L, Carlsson SG, Gale EN, Jansson TG. Stress-induced muscular activity in mandibular dysfunction: effects of biofeedback training. *J Behav Med.* 1985; 8(2): 191-200.

Dal-Zotto S, Martí O, Armario A. Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology.* 2003; 28(8): 992-1009.

Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amígdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci.* 2001; 14(7): 1143-52.

- De Pablo JM, Parra A, Segovia S, Guillamón A. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. *Physiol Behav.* 1989; 46(2): 229-37.
- Del Castillo J, Katz B. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J Physiol.* 1954; 124(3): 574-585.
- Dietze S, Lees KR, Fink H, Brosda J, Voigt JP. Food deprivation, body weight loss and anxiety-related behavior in rats. *Animals (Basel).* 2016; 6(1): 4.
- Dimov DT, Dimov I. Muscle fiber types and fiber morphometry in the soleus muscle of the rat. *Medicine and Biology.* 2007; 14(3): 121-127.
- Directiva 86/609/EEC del Consejo de la Comunidad Europea de noviembre de 1986 para la manipulación de animales de laboratorio. Acceso online: [https://www.mapa.gob.es/va/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/convenio123\\_tcm39-110078.pdf](https://www.mapa.gob.es/va/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/convenio123_tcm39-110078.pdf).
- Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Acceso online: <https://www.boe.es/doue/2010/276/L00033-00079.pdf>.
- Domingo A, Mayoral O, Monterde S, Santafé MM. Neuromuscular damage and repair after dry needling in mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:260806.
- Dommerholt J. Dry needling: peripheral and central considerations. *J Man Manip Ther.* 2011; 19(4): 223-227.
- Douglas AJ. Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses of the Hypothalamo-pituitary-adrenal axis: adaptations through pregnancy and lactation. *Stress.* 2005; 8(1): 5-18.
- Dufort RH, Abrahamson DS. Water intake of the rat as a function of duration of water deprivation. *Psychol Rep.* 1966; 18(1): 148-50.
- Dumitru D. *Electrodiagnostic Medicine.* Hanley & Belfus. Philadelphia. 1995.

Dumitru D, King JC, Nandedkar SD. Concentric/monopolar needle electrode modeling: spatial recording territory and physiologic implications. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1997; 105(5): 370-8.

Durette MR, Rodriguez AA, Agre JC, Silverman JL. Needle electromyographic evaluation of patients with myofascial or fibromyalgic pain. *Am J Phys Med Rehabil.* 1991; 70(3): 154-6.

Duxson MJ, Vrbová G. Inhibition of acetylcholinesterase accelerates axon terminal withdrawal at the developing rat neuromuscular junction. *J Neurocytol.* 1985; 14(3): 337-63.

## E

Eriksson E, Royo F, Lyberg K, Carlsson HE, Hau J. Effect of metabolic cage housing on immunoglobulin A and corticosterone excretion in faeces and urine of young male rats. *Exp Physiol.* 2004; 89(4): 427-33.

Ertekin C, Araç N, Uludağ B, Karaca Z. Enhancement of “end-plate monophasic waves” during an attack of hypokalemic periodic paralysis. *Muscle Nerve.* 1996; 19(5): 680-1.

Erzen I, Cvetko E, Obreza S, Angaut-Petit D. Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. *J Neurosci Res.* 2000; 59(5): 692-7.

## F

Falla D, Farina D. Neuromuscular adaptation in experimental and clinical neck pain. *J Electromyogr Kinesiol.* 2008; 18(2): 255-61.

Friedl KE, Moore RJ, Hoyt RW, Marchitelli LJ, Martinez-Lopez LE, Askew EW. Endocrine markers of semistarvation in healthy lean men in a multistressor environment. *J Appl Physiol (1985).* 2000; 88(5): 1820-30.

Friedman MI, Stricker EM. The physiological psychology of hunger: a physiological prespective. *Psychol Rev.* 1976; 83(6): 409-31.

## G

Garlick PJ, Millward DJ, James WP. The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in vivo in meal-fed rats. *Biochem J.* 1973; 136(4): 935-45.

Ge HY, Fernandez-de-las-Peñas C, Arendt-Nielsen L. Sympathetic facilitation of hyperalgesia evoked from myofascial tender and trigger points in patients with unilateral shoulder pain. *Clin Neurophysiol.* 2006; 117(7): 1545-50.

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: 13.

Gerwin RD. Neurobiology of the myofascial trigger point. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1994; 8(4): 747-62.

Gerwin RD, Shannon S, Hong CZ, Hubbard D, Gevirtz R. Interrater reliability in myofascial trigger point examination. *Pain.* 1997; 69(1-2): 65-73.

Gerwin RD, Dommerholt J, Shah JP. An expansion of Simons' integrated hypothesis of trigger point formation. *Curr Pain Headache Rep.* 2004; 8(6): 468-75.

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 non myalgic human subjects: Preliminary results. *Pain Med.* 2020; 21(10): 2348-2356.

Geuze E, Westenberg HG, Jochims A, de Kloet CS, Bohus M, Vermetten E, Schmahl C. Altered pain processing in veterans with posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2007; 64(1): 76-85.

- Gil MC, Aguirre JA, Lemoine AP, Segura ET, Barontini M, Armando I. Influence of age on stress responses to metabolic cage housing in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 1999; 19(5): 625-33.
- Gimenez-Donoso C, Bosque M, Vila A, Vilalta G, Santafe MM. Effects of a fat-rich diet on the spontaneous release of acetylcholine in the neuromuscular junction of mice. *Nutrients*. 2020. 12(10): 3216.
- Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. 19-Nordeoxycorticosterone, aldosterone, and corticosterone excretion in sequential urine samples from male and female rats. *Steroids*. 1991; 56(8): 451-4.
- Graven-Nielsen T, Svensson P, Arendt-Nielsen L. Effects of experimental muscle pain on muscle activity and co-ordination during static and dynamic motor function. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1997; 105(2): 156-64.
- Green CS, Olson RE, Laskin DM. Psychological factors in the etiology, progression, and treatment of MPD syndrome. *J Am Dent Assoc*. 1982; 105(3): 443-8.
- Gunn CC. Radiculopathic pain: Diagnosis and treatment of segmental irritation or sensitization. *J Musculoskelet Pain*. 1997; 5(4): 119-34.

## H

- Hägg GM. Interpretation of EMG spectral alterations and alteration indexes at sustained contraction. *J Appl Physiol (1985)*. 1992; 73(4): 1211-7.
- Hains G, Descarreaux M, Hains F. Chronic shoulder pain of myofascial origin: a randomized clinical trial using ischemic compression therapy. *J Manipulative Physiol Ther*. 2010; 33(5): 362-9.
- Han JJ, Carter GT, Ra JJ, Abresch RT, Chamberlain JS, Robinson LR. Electromyographic studies in mdx and wild-type C57 mice. *Muscle Nerve*. 2006; 33(2): 208-14.

- Hatch JP, Moore PJ, Cyr-Provost M, Boutros NN, Seleshi E, Borcharding S. The use of electromyography and muscle palpation in the diagnosis of tension-type headache with and without pericranial muscle involvement. *Pain*. 1992; 49(2): 175-8.
- Hawkins J, Hicks RA, Phillips N, Moore JD. Swimming rats and human depression. *Nature*. 1978; 274(5670): 512-3.
- Hawkins J, Phillips N, Moore JD, Gilliland MA, Dunbar S, Hicks RA. Emotionality and REMD: a rat swimming model. *Physiol Behav*. 1980; 25(2): 167-71.
- Heruti I, Levy S, Avitsur R. Physical injury, health, and well-being: Role of stress perception. *Injury*. 2018; 49(8): 1546-1551.
- Hilakivi-Clarke LA, Durcan MJ, Lister RG, Linnoila M. Effect of tryptophan on the behavior of nonstressed and stressed mice in Porsolt's swim test. *Pharmacol Biochem Behav*. 1990; 37(2): 273-6.
- Holy TE, Guo Z. Ultrasonic songs of male mice. *PLoS Biol*. 2005; 3(12): e386.
- Howard JE, McGill KC, Dorfman LJ. Properties of motor unit action potentials recorded with concentric and monopolar needle electrodes: ADEMG analysis. *Muscle Nerve*. 1988; 11(10): 1051-5.
- 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.
- Hubbard DR, Berkoff GM. Myofascial trigger points show spontaneous needle EMG activity. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1993; 18(13): 1803-7.
- 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): 340-56.
- Hughes JE, Amyx H, Howard JL, Nanry KP, Pollard GT. Health effects of water restriction to motivate lever-pressing in rats. *Lab Anim Sci*. 1994; 44(2): 135-40.

## I

Intrieri RC, Jones GE, Alcorn JD. Masseter muscle hyperactivity and myofascial pain dysfunction syndrome: a relationship under stress. *J Behav Med.* 1994; 17(5): 479-500.

Ito Y, Miledi R, Vincent A. Transmitter release induced by a "factor" in rabbit serum. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1974; 187(1087): 235-41.

## J

Jaeger B. Myofascial trigger point pain. *Alpha Omegan.* 2013; 106 (1-2): 14-22.

Jafri MS. Mechanisms of myofascial pain. *Int Sch Res Notices.* 2014; 2014: 523924.

James RS, Altringham JD, Goldspink DF. The mechanical properties of fast and slow skeletal muscles of the mouse in relation to their locomotory function. *J Exp Biol.* 1995; 198 (Pt 2): 491-502.

Jefferys D, Funder JW. The forced swimming test: effects of glucose administration on the response to food deprivation and adrenalectomy. *Eur J Pharmacol.* 1991; 205(3): 267-9.

Jensen MP, Turner JA, Romano JM, Karoly P. Coping with chronic pain: a critical review of the literature. *Pain.* 1991; 47(3): 249-283.

Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(6): 459-66.

Jones DA, Newham DJ, Clarkson PM. Skeletal muscle stiffness and pain following eccentric exercise of the elbow flexors. *Pain.* 1987; 30(2): 233-42.



## K

- Kala M, Shaikh MV, Nivsarkar M. Development and optimization of psychological stress model in mice using 2 level full factorial design. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016; 82: 54-61.
- Kalliokoski O, Jacobsen KR, Darusman HS, Henriksen T, Weimann A, Poulsen HE, Hau J, Abelson KS. Mice do not habituate to metabolism cage housing – a three week study of male BALB/c mice. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58460.
- Kapel L, Glaros AG, McGlynn FD. Psychophysiological responses to stress in patients with myofascial pain- dysfunction syndrome. *J Behav Med*. 1989; 12(4): 397-406.
- Kavalali ET, Chung C, Khvotchev M, Leitz J, Nosyreva E, Raingo J, Ramirez DM. Spontaneous neurotransmission: an independent pathway for neuronal signaling?. *Physiology (Bethesda)*. 2011; 26(1): 45-53.
- Kim KS, Han PL. Optimization of chronic stress paradigms using anxiety – and depression – like behavioral parameters. *J Neurosci Res*. 2006; 83(3): 497-507.
- Kimura J. Techniques to assess muscle function. En: *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice*. Oxford University press. New York (United States). 2001.
- Kravitz E, Moore ME, Glaros A. Paralumbar muscle activity in chronic low back pain. *Arch Phys Med Rehabil*. 1981; 62(4): 172-6.
- Kristiansen ES, Nielsen LS, Christensen SS, Botvid SHC, Nørgaard Poulsen J, Gazerani P. Sleep deprivation sensitizes human craniofacial muscles. *Somatosens Mot Res*. 2017; 34(2): 116-122.
- Kuan TS, Hsieh YL, Chen SM, Chen JT, Yen WC, Hong CZ. The myofascial trigger point region: correlation between the degree of irritability and the prevalence of endplate noise. *Am J Phys Med Rehabil*. 2007; 86(3): 183-9.

Kulkarni MP, Juvekar AR. Attenuation of acute and chronic restraint stress-induced perturbations in experimental animals by *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70(3): 327-32.

Kuraoka K, Nakamura K. Chapter 5.3 – Vocalization as a specific trigger of emotional responses. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. En: *Handbook of mammalian vocalization. An integrative neuroscience approach*. Editorial: Stefan M Brudzynski. San Diego (United States). 2010.

## L

La Porta C, Tappe-Theodor A. Differential impact of psychological and psychophysical stress on low back pain in mice. *Pain.* 2020; 161(7): 1442-1458.

Laskin DM, Block S. Diagnosis and treatment of myofascial pain-dysfunction (MPD) syndrome. *J Prosthet Dent.* 1986; 56(1): 75-84.

LeResche L, Dworkin SF. Facial expressions of pain and emotions in chronic TMD patients. *Pain.* 1988; 35(1): 71-8.

Liley AW. An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the rat. *J Physiol.* 1956; 132(3): 650-66.

Litvin Y, Blanchard DC, Blanchard RJ. Rat 22kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behav Brain Res.* 2007; 182(2): 166-72.

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.

Lucas KR, Rich PA, Polus BI. Muscle activation patterns in the scapular positioning muscles during loaded scapular plane elevation: the effects of latent myofascial trigger points. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2010; 25(8): 765-70.

Lueptow LM. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *J Vis Exp.* 2017; (126): 55718.

Lund JP, Donga R, Widmer CG, Stohler CS. The pain-adaptation model: a discussion of the relationship between chronic musculoskeletal pain and motor activity. *Can J Physiol Pharmacol.* 1991; 69(5): 683-94.

Lundberg U, Forsman M, Zachau G, Eklöf M, Palmerud G, Melin B, Kadefors R. Effects of experimentally induced mental and physical stress on motor unit recruitment in the trapezius muscle. *Work and stress.* 2002; 16(2): 166-78.

## M

Macedo CS, Alonso CS, Liporaci RF, Vieira F, Guirro RR. Cold water immersion of the ankle decreases neuromuscular response of lower limb after inversion movement. *Braz J Phys Ther.* 2014; 18(1): 93-7.

Macefield VG. Spontaneous and evoked ectopic discharges recorded from single human axons. *Muscle Nerve.* 1998; 21(4): 461-8.

Maekawa K, Clark GT, Kuboki T. Intramuscular hypoperfusion, adrenergic receptors and chronic pain. *J Pain.* 2002; 3(4): 251-60.

Magleby KL, Miller DC. Is the quantum of transmitter release composed of subunits? A critical analysis in the mouse and frog. *J Physiol.* 1981; 3(11): 267-87.

Malanga GA, Cruz Colon EJ. Myofascial low back pain: a review. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2010; 21(4): 711-24.

Malatová Z, Ahlers I. Diurnal rhythm corticosterone in fasted rats. *Endocrinol Exp.* 1977; 11(4): 241-7.

Mana M, Grace A. Chronic cold stress alters the basal and evoked electrophysiological activity of rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience.* 1997; 81(4): 1055-64.

Manser CE, Morris TH, Broom DM. An investigation into the effects of solid or grid cage flooring on the welfare of laboratory rats. *Lab Anim.* 1995; 29(4): 353-63.

- Margalef R, Sisquella M, Bosque M, Romeu C, Mayoral O, Monterde S, Priego M, Guerra-Perez R, Ortiz N, Tomás J, Santafe MM. Experimental myofascial trigger point creation in rodents. *J Appl Physiol*. 2019; 126(1): 160-169.
- Martí O, Armario A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci*. 1998; 16(3-4): 241-60.
- Martínez-Lavin M. Fibromyalgia as a sympathetically maintained pain síndrome. *Curr Pain Headache Rep*. 2004; 8(5): 385-9.
- Maselli RA. End-plate electromyography: use of spectral analysis of end-plate noise. *Muscle Nerve*. 1997; 20(1): 52-8.
- McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 2007; 87(3): 873-904.
- McNulty WH, Gevirtz RN, Hubbard DR, Berkoff GM. Needle electromyographic evaluation of trigger point response to a psychological stressor. *Psychophysiology*. 1994; 31(3): 313–6.
- 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). 2003; 94(6): 2494-501.
- Mense S, Gerwin RD. *Muscle pain: Understanding the mechanisms*. Editores: Mense, Siegfried, Gerwin, Robert D. Editorial: Springer-Verlag, Berlin. 2010.
- Mercuri LG, Olson RE, Laskin DM. The specificity of response to experimental stress in patients with myofascial pain dysfunction syndrome. *J Dent Res*. 1979; 58(9): 1866-71.
- Mills KR, Edwards RH. Investigate strategies for muscle pain. *J Neurol Sci*. 1983; 58(1): 73-8.
- Mills KR. The basics of electromyography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76(2): ii32-5.

Misslin R, Cigrang M. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? Behavioural processes. 1986;12(1): 45-50.

Miyamoto T, Funakami Y, Kawashita E, Nomura A, Sugimoto N, Saeki H, Tsubota M, Ichida S, Kawabata A. Repeated cold stress enhances the acute restraint stress-induced hyperthermia in mice. Biol Pharm Bull. 2017; 40(1): 11-16.

Molendijk ML, de Kloet ER. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. Psychoneuroendocrinology. 2015; 62: 389-91.

Molendijk ML, de Kloet ER. Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. Behav Brain Res. 2019; 364: 1-10.

Monteiro S, Roque S, de Sá-Calçada D, Sousa N, Correia-Neves M, Cerqueira JJ. An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. Front Psychiatry. 2015; 6:6.

Moss RA. A structural imbalance/muscular hyperactivity interactional theory of common migraine pain. Cranio. 1988; 6(1): 87-9.

Murphy E, King EA. Testing the accuracy of smartphones and sound level meter applications for measuring environmental noise. Applied Acoustics. 2016; 106: 16-22.

Murua VS, Molina VA. An opiate mechanism involved in conditioned analgesia influences forced swim-induced immobility. Physiol Behav. 1990; 48(5): 641-5.

## N

Nadal R, Armario A. Mecanismos de susceptibilidad al estrés. Hipertens riesgo vasc. 2010; 27(3): 117-124.

Nandedkar SD, Sanders DB. Recording characteristics of monopolar EMG electrodes. Muscle Nerve. 1991; 14(2): 108-12.

Nemeroff CB, Widerlöv E, Bissette G, Walléus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*. 1984; 226(4680): 1342-4.

Niddam DM, Chan RC, Lee SH, Yeh TC, Hsieh JC. Central representation of hyperalgesia from myofascial trigger point. *Neuroimage*. 2008; 39(3): 1299–306.

Niddam DM. Brain manifestation and modulation of pain from myofascial trigger points. *Curr Pain Headache Rep*. 2009; 13(5): 370–5.

Nouwen A, Bush C. The relationship between paraspinal EMG and chronic low back pain. *Pain*. 1984; 20(2): 109-23.

Nyby J, Wysocki CJ, Whitney G, Dizinno G. Pheromonal regulation of male mouse ultrasonic courtship (*Mus musculus*). *Anim Behav*. 1977; 25(2): 333-41.

## P

Parker MW. A dynamic model of etiology in temporomandibular disorders. *J Am Dent Assoc*. 1990; 120(3): 283-90.

Partanen JV, Ojala TA, Arokoski JP. Myofascial síndrome and pain: A neurophysiological approach. *Pathophysiology*. 2010; 17(1): 19-28.

Patchev VK. Experimental models of stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006; 8(4): 417-432.

Pavlov D, Bettendorff L, Gorlova A, Olkhovik A, Kalueff AV, Ponomarev ED, Inozemtsev A, Chekhonin V, Lesch KP, Anthony DC, Strekalova T. Neuroinflammation and aberrant hippocampal plasticity in a mouse model of emotional stress evoked by exposure to ultrasound of alternating frequencies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019; 90: 104-116.

Peled ES, Newman ZL, Isacoff EY. Evoked and spontaneous transmission favored by distinct sets of synapses. *Curr Biol*. 2014; 24(5): 484-93.

Petrovic P, Ingvar M, Stone-Elander S, Petersson KM, Hansson P. A PET activation study of dynamic mechanical allodynia in patients with mononeuropathy. *Pain*. 1999; 83(3): 459-70.

Pletnicov MV, Storozheva ZI, Sherstnev VV. Developmental analysis of habituation of acoustic startle in the preweanling and adult rats. *Behav Processes*. 1995; 34(3): 269-77.

Ploghaus A, Narain C, Beckmann CF, Clare S, Bantick S, Wise R, Matthews PM, Rawlins JN, Tracey I. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci*. 2001; 21(24): 9896-903.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977a; 266(5604): 730-2.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977b; 229(2): 327-36.

Portfors CV. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007; 46(1): 28-34.

Prodanov D, Thil MA, Marani E, Delbeke J, Holsheimer J. Three-dimensional topography of the motor endplates of the rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve*. 2005; 32(3): 292-302.

## Q

Quintner JL, Cohen ML. Referred pain of peripheral nerve origin: an alternative to the "myofascial pain" construct. *Clin J Pain*. 1994; 10(3): 243-51.

## R

Ramos A, Mormède P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 1998; 22(1): 33-57.

- Rathbone ATL, Grosman-Rimon L, Kumbhare DA. Interrater agreement of manual palpation for identification of myofascial trigger points: A systematic review and meta-analysis. *Clin J Pain*. 2017; 33(8): 715-729.
- Ravanelle R, Santolucito HB, Byrnes EM, Byrnes JJ, Donaldson ST. Housing environment modulates physiological and behavioral responses to anxiogenic stimuli in trait anxiety male rats. *Neuroscience*. 2014; 270: 76-87.
- Ribot-Ciscar E, Rossi-Durand C, Roll JP. Increased muscle spindle sensitivity to movement during reinforcement manoeuvres in relaxed human subjects. *J Physiol*. 2000; 523(1): 271-82.
- Roberts WJ, Elardo SM. Sympathetic activation of A-delta nociceptors. *Somatosens Res*. 1985; 3(1): 33-44.
- Romano C, Corsetti G, Flati V, Pasini E, Picca A, Calvani R, Marzetti E, Dioguardi FS. Influence of diets with varying essential / nonessential amino acid ratios on mouse lifespan. *Nutrients*. 2019; 11(6): 1367.
- Rugh JD, Montgomery GT. Physiological reactions of patients with TM disorders vs symptom-free control son a physical stress task. *J Craniomandib Disord*. 1987; 1(4): 243-50.
- Russell WMS, Burch LR. *The principles of humane experimental technique*. Methuen & CO; London (UK). 1959.
- Russell PA. Relationships between exploratory behaviour and fear: a review. *Br J Psychol*. 1973; 64(3): 417-33.

## S

- Sahin Z, Solak H, Koc A, Ozen Koca R, Ozkurkculer A, Cakan P, Solak Gormus ZI, Kutlu S, Kelestimur H. Long-term metabolic cage housing increases anxiety/depression-related behaviours in adult male rats. *Arch Physiol Biochem*. 2019; 125(2): 122-127.



- Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 389-442.
- Santafé M, García N, Lanuza MA, Tomás J. Registro intracelular en el modelo neuromuscular. En: *Neurobiología un aproximación clínica y experimental.* Editorial: Servei Lingüístic. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona. 2000.
- Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomás J. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience.* 2001; 102(3): 697-708.
- Santafé M, García N, Lanuza MA, Tomás J. Histofisiología Muscular. Placa Motora. En: *Fisioterapia en el Síndrome de dolor Miofascial.* Editorial: Comunicación e Imágen ONCE, Madrid. 2002.
- Santafé MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomás 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): 2048-56.
- 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.* 2015; 42(2): 1775-87.
- Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 1986; 396(1): 64-76.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000; 21(1): 55-89.
- Saxena B, Singh S. Comparison of three acute stress models for simulating the pathophysiology of stress - related mucosal disease. *Drug Discov Ther.* 2017; 11(2): 98-103.

- Schmidt MV, Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Alam S, Harbich D, Greetfeld M, Uhr M, Holsboer F, Müller MB. Persistent neuroendocrine and behavioral effects of a novel, etiologically relevant mouse paradigm for chronic social stress during adolescence. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32(5): 417-29.
- Schmidt MV, Sterlemann V, Müller MB. Chronic stress and individual vulnerability. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1148: 174-83.
- Schommer NC, Hellhammer DH, Kirschbaum C. Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic-adrenal-medullary system to repeated psychosocial stress. *Psychosomatic Medicine*. 2003; 65(3): 450-460.
- Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, “anomalous anxiolysis” and activity. *PLoS One*. 2009; 4(1): e4326
- Selye H. The physiology and pathology of exposure to stress; a treatise base don the concepts of the general adaptation síndrome and the diseases of adaptation. *Ind Med Gaz*. 1952; 87(9): 431.
- Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(1): 57-91.
- Sewell GD. Ultrasonic communication in rodents. *Nature*. 1970; 227(5256): 410.
- Shah JP, Phillips TM, Danoff JV, Gerger LH. An in vivo microanalytical technique for measuring the local biochemical milieu of human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2005; 99(5): 1977-84.
- 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): 371-84.
- Shah JP, Thaker N, Heimur J, Aredo JV, Sikdar S, Gerber L. Myofascial trigger points then and now: A historical and scientific perspective. *PM R*. 2015; 7 (7): 746-761.

- Sher J, Cardasis C. Skeletal muscle fiber types in the adult mouse. *Acta Neurol Scand.* 1976; 54(1): 45-56.
- Sherman HB, Walker Fo, Donofrio PD. Sensitivity for detecting fibrillation potentials: a comparison between concentric and monopolar needle electrodes. *Muscle Nerve.* 1990; 13(11): 1023-6.
- Shukitt-Hale B, Askew EW, Lieberman HR. Effects of 30 days of undernutrition on reaction time, mood, and symptoms. *Physiol Behav.* 1997; 62(4): 783-9.
- Simonov PV. Brain mechanisms of emotions. *Neurosci Behav Physiol.* 1997; 27(4): 405-13.
- Simons DG, Stolov WC. Microscopic features and transient contraction of palpable bands in canine muscle. *Am J Phys Med.* 1976; 55(2): 65-88.
- Simons DG. The nature of myofascial trigger points. *Clin J Pain.* 1995; 11(1): 83-4.
- 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.
- Simons DG, Mense S. Understanding and measurement of muscle tone as related to clinical muscle pain. *Pain.* 1998; 75(1): 1-17.
- Simons DG, Travell JG, Simons LS. Myofascial pain and dysfunction: the trigger point manual, vol.1. MD: Lippincott/William&Wilkins, Philadelphia PA/Baltimore. 1999.
- Simons DG, Travell JG, Simons LS. Dolor y disfunción miofascial. El manual de los puntos gatillo. Mitad superior del cuerpo. Editorial: Médica Panamericana, Madrid. 2002a.
- Simons DG, Hong CZ, Simons LS. Endplate potentials are common to midfiber myofascial trigger points. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002b; 81(3): 212-22.

- Simons DG. Review of enigmatic MTrPs as a common cause of enigmatic musculoskeletal pain and dysfunction. *J Electromyogr Kinesiol.* 2004; 14(1): 95-107.
- Skoluda N, Strahler J, Schlotz W, Niederberger L, Marques S, Fischer S, Thoma MV, Spoerri C, Ehlert U, Nater UM. Intra-individual psychological and physiological responses to acute laboratory stressors of different intensity. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 51: 227-36.
- Skootsky SA, Jaeger B, Oye RK. Prevalence of myofascial pain in general internal medicine practice. *West J Med.* 1989; 151(2): 157-60.
- Sola AE, Rodemberger ML, Gettys BB. Incidence of hypersensitive areas in posterior shoulder muscles; a survey of two hundred young adults. *Am J Phys Med.* 1955; 34(6): 585-90.
- Son H, Yang JH, Kim HJ, Lee DK. A chronic immobilization stress protocol for inducing depression-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2019; 147: 1-7.
- Stechman MJ, Ahmad BN, Loh NY, Reed AA, Stewart M, Wells S, Hough T, Bentley L, Cox RD, Brown SD, Thakker RV. Establishing normal plasma and 24-hour urinary biochemistry ranges in C3H, BALB/c and C57BL/6J mice following acclimatization in metabolic cages. *Lab Anim.* 2010; 44(3): 218-25.
- Stholer CS, Zhang X, Lund JP. The effect of experimental jaw muscle pain on postural muscle activity. *Pain.* 1996; 66(2-3): 215-21.
- Stoeter P, Bauermann T, Nickel R, Corluka L, Gawehn J, Vucurevic G, Vossel G, Egle UT. Cerebral activation in patients with somatoform pain disorder exposed to pain and stress: an fMRI study. *Neuroimage.* 2007; 36(2): 418-30.
- Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29(11): 2007-17.

Svensson P, Graven-Nielsen T, Matre D, Arendt-Nielsen L. Experimental muscle pain does not cause long-lasting increases in resting electromyographic activity. *Muscle Nerve*. 1998; 21(11): 1382-9.

Svensson P, Wang K, Sessle BJ, Arendt-Nielsen L. Associations between pain and neuromuscular activity in the human jaw and neck muscles. *Pain*. 2004; 109(3): 225-32.

## T

Thompson RF, Spencer WA. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev*. 1966; 73(1): 16-43.

Thornton EW, Bradbury GE, Davies C. Increased immobility in an automated forced swimming test following lesion of the habénula in rats: absence of evidence for a contribution from motor impairment. *Behav Neurosci*. 1990; 104(1): 37-43.

Tomás J, Lanuza MA, Santafé M, Fenoll-Brunet MR, Garcia N. Topological differences along mammalian motor nerve terminals for spontaneous and alpha-bungarotoxin-induced sprouting. *Histol Histopathol*. 2000; 15(1): 43-52.

Torisu T, Wang K, Svensson P, De Laat A, Fujii H, Arendt-Nielsen L. Effect of low-level clenching and subsequent muscle pain on exteroceptive suppression and resting muscle activity in human jaw muscles. *Clin Neurophysiol*. 2007; 118(5): 999-1009.

Toth LA, Gardiner TW. Food and water restriction protocols: physiological and behavioral considerations. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2000; 39(6): 9-17.

Travell JG, Rinzler S, Herman M. Pain and disability of the shoulder and arm. Treatment by intramuscular infiltration with procaine hydrochloride. *J Am Med Assoc*. 1942; 120: 417-422.

Treaster D, Marras WS, Burr D, Sheedy JE, Hart D. Myofascial trigger point development from visual and postural stressors during computer work. *J Electromyogr Kinesiol*. 2006; 16(2): 115-24.

Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, Tanida M, Tajiri M, Hazama K, Ogata K, Hashimoto H, Baba A. PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. *Stress*. 2011; 14(4): 368-75.

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*. 2013; 35(2): 173-87.

## U

Uematsu A, Kikusui T, Kihara T, Harada T, Kato M, Nakano K, Murakami O, Koshida N, Takeuchi Y, Mori Y. Maternal approaches top up ultrasonic vocalizations produced by a nanocrystalline silicon thermo-acoustic emitter. *Brain Res*. 2007; 1163: 91-9.

Ulrich-Lay YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10(6):397-409.

## V

Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Anim*. 1997; 31(2): 133-43.

Van Putten MJ, Padberg M, Tavy DL. In vivo analysis of end-plate noise of human extensor digitorum brevis muscle after intramuscularly injected botulinum toxin type A. *Muscle Nerve*. 2002; 26(6): 784-90.

Vlaeyen JW, Linton SJ: Fear-avoidance and its consequences in chronic musculoskeletal pain: a state of the art. *Pain*. 2000; 85(3): 317-332.

## W

- Wall PD, Waxman S, Basbaum AI. Ongoing activity in peripheral nerve: injury discharge. *Exp Neurol.* 1974; 45(3): 576-89.
- Walmsley B, Hodgson JA, Burke RE. Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J Neurophysiol.* 1978; 41(5): 1203-16.
- Weeks VD, Travell J. How to give painless injections. En: *AMA Scientific Exhibits: Grune & Stratton, New York, NY; 1957.*
- Whittaker AL, Howarth GS, Hickman DL. Effects of space allocation and housing density on measures of wellbeing in laboratory mice: a review. *Lab Anim.* 2012; 46(1): 3-13.
- Whittaker AL, Lynn KA, Howarth GS. Effects of metabolic cage housing on rat behavior and performance in the social interaction test. *J Appl Anim Welf Sci.* 2016; 19(4): 363-74.
- Wiederholt WC. End-plate noise. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1968; 25(4): 404.
- Wigston DJ. Repeated in vivo visualization of neuromuscular junctions in adult mouse lateral gastrocnemius. *J Neurosci.* 1990; 10(6): 1753-61.
- Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl).* 1984; 83(1): 1-16.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl).* 1987; 93(3): 358-64.
- Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1992; 16(4): 525-34.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10- year review and evaluation. *Psychopharmacology.* 1997; 134(4): 319-29.

Wood GE, Norris EH, Waters E, Stoldt JT, McEwen BS. Chronic immobilization stress alters aspects of emotionality and associative learning in the rat. *Behav Neurosci*. 2008; 122(2): 282-92.

Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest*. 2017; 127(1): 43-54.

## Y

Yi I, Stephan FK. The effects of food deprivation, nutritive and non-nutritive feeding and wheel running on gastric stress ulcers in rats. *Physiol Behav*. 1998; 63(2): 219-25.

Yin X, Yu T, Chen B, Xu J, Chen W, Qi Y, Zhang P, Li Y, Kou Y, Ma Y, Han N, Wan P, Luo Q, Zhu D, Jiang B. Spatial distribution of motor endplates and its adaptive change in skeletal muscle. *Theranostics*. 2019; 9(3): 734-746.

Yoshihara T, Shigeta K, Hasegawa H, Ishitani N, Masumoto Y, Yamasaki Y. Neuroendocrine responses to psychological stress in patients with myofascial pain. *J Orofac Pain*. 2005; 19(3): 202-8.

Yunus MB. Diagnosis, etiology, and management of fibromyalgia síndrome: an update. *Compr Ther*. 1988; 14(4): 8-20.

## Z

Zhong F, Liu L, Wei JL, Hu ZL, Li L, Wang S, Xu JM, Zhou XF, Li CQ, Yang ZY, Dai RP. Brain-derived neurotrophic factor precursor in the hippocampus regulates both depressive and anxiety- like behaviors in rats. *Front Psychiatry*. 2019; 9:776.









UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI