

UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA
SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD

TESIS DOCTORAL

CAMBIOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS
CON LA PERCEPCIÓN DEL DOLOR, LA
RESPUESTA AL ESTRÉS Y EL DAÑO
TISULAR ASOCIADOS A UNA
MANIPULACIÓN VERTEBRAL

PRESENTADA POR:
ALEXANDER ACHALANDABASO OCHOA

DIRIGIDA POR:
DR. D. ANTONIO MARTÍNEZ AMAT
DR. D. FRANCISCO J. MOLINA ORTEGA

JAÉN, 26 DE FEBRERO DE 2015

ISBN 978-84-8439-976-6

A mi familia de siempre, Aita, Mami y Naná;

A mi nueva familia Virginia y Lucia;

A mis amigos;

A vosotros en los que me apoyo

y os debo lo que soy.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DE JAÉN

**CAMBIOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS CON LA PERCEPCIÓN
DEL DOLOR, LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y EL DAÑO TISULAR
ASOCIADOS A UNA MANIPULACIÓN VERTEBRAL**

Alexander Achalandabaso Ochoa

Directores de Tesis

Dr. D. Antonio Martínez Amat
Phd
Profesor Contratado Doctor
Universidad de Jaén

Dr. D. Francisco J. Molina Ortega
Phd
Profesor Contratado Doctor
Universidad de Jaén

Jaén, 12 de Enero de 2015



Profesor Dr. Antonio Martínez Amat
Profesor Contratado Doctor

Profesor Dr. Francisco J. Molina Ortega
Profesor Contratado Doctor

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad de Jaén

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. Antonio Martínez Amat y el Dr. Francisco J. Molina Ortega como Directores de la Tesis Doctoral titulada “*Cambios bioquímicos relacionados con la percepción del dolor, la respuesta al estrés y el daño tisular asociados a una Manipulación Vertebral*”, realizada por Don. **ALEXANDER ACHALANDABASO OCHOA** en el Departamento de Ciencias de la Salud **autorizan su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 56/2005 y 778/98, en Jaén a 12 de Enero de 2015.

Dr. D. Antonio Martínez Amat

Dr. D. Francisco J. Molina Ortega

ÍNDICE

LISTA DE PUBLICACIONES	1
RESUMEN	3
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	7
1 Concepto de Manipulación Vertebral	7
2 Efectos de la Manipulación vertebral	7
2.1 Cambios en la función	9
2.1.1 Cambios en el Rango de Movimiento	9
2.2 Cambios en la percepción del dolor	10
2.2.1 Elementos de medida	10
2.2.1.1 Algometría	10
2.2.1.2 Otras formas de valoración	10
2.2.2 Mecanismos inhibitorios del dolor	10
2.2.2.1 Mecanismos inhibitorios segmentarios	10
2.2.2.2 Mecanismos inhibitorios descendentes	11
2.2.3 Factores contribuyentes a la modificación de la percepción del dolor	12
2.2.3.1 Modificación del sistema motor reflejo	12
2.2.3.2 Modificación de la actividad del Sistema Nervioso Simpático	13
2.2.3.3 Respuestas de estrés	15
2.2.3.4 Modificación de la concentración de químicos en el medio interno	16
3 Químicos con un papel antinociceptivo analizados en la presente tesis	17
3.1 Sustancia P	17
3.2 Neurotensina	18
3.3 Oxitocina	18
3.4 Óxido nítrico	19
3.5 Cortisol	19
3.6 Orexina A	20
4 Efectos adversos asociados a la Manipulación Vertebral	20
4.1 Efectos adversos y Manipulación Vertebral Cervical	24
4.1.1 Efectos adversos mayores o catastróficos	24
4.1.1.1 Accidentes cerebrovasculares	24
4.1.1.2 Parálisis	28
4.1.1.3 Hernias Discales	28
4.1.1.4 Otros	29
4.1.2 Efectos adversos leves y moderados:	29
4.1.2.1 Efectos adversos leves y moderados de naturaleza musculoesquelética	29
4.1.2.2 Efectos adversos leves y moderados de naturaleza no musculoesquelética	29
4.2 Efectos adversos y Manipulación Vertebral Torácica	30
4.3 ¿Cómo disminuir la incidencia de los efectos adversos?	30
5 Marcadores de daño tisular	31
5.1 Creatínfosfoquinasa	32
5.2 Troponina	32

5.3	Mioglobina	32
5.4	Proteína C reactiva	32
5.5	Enolasa neuro-específica	33
5.6	Aldolasa	33
5.7	Lactato deshidrogenasa	33
BIBLIOGRAFÍA		35
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN		51
	Planteamiento del problema	51
OBJETIVOS		53
MATERIAL Y MÉTODOS		55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		61
Artículo I		63
Artículo II		75
Artículo III		85
CONCLUSIONES		95
AGRADECIMIENTOS		97

LISTA DE PUBLICACIONES

La siguiente memoria de tesis está compuesta por los siguientes artículos científicos:

- I.** Plaza-Manzano G, Molina-Ortega F, Lomas-Vega R, Martínez-Amat A, Achalandabaso A, Hita-Contreras F. Changes in Biochemical Markers of Pain Perception and Stress Response After Spinal Manipulation. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2014 Apr;44(4):231–9.

- II.** Molina-Ortega F, Lomas-Vega R, Hita-Contreras F, Plaza-Manzano G, Achalandabaso A, Ramos-Morcillo AJ, Martínez-Amat A. Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception. *Manual Therapy* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2014.02.007>

- III.** Achalandabaso A, Martínez-Amat A, Lomas-Vega R, Plaza-Manzano G, Camacho MV, Gassó M, Hita-Contreras F, Molina-Ortega F. Tissue damage markers after a spinal manipulation in healthy subjects: A preliminary report of a randomized controlled trial. *Disease Markers.* Volume 2014, Article ID 815379, 7 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/815379>

RESUMEN

La manipulación vertebral es una técnica ampliamente utilizada en el tratamiento del dolor de origen musculoesquelético desde tiempos de Hipócrates (400 AC).

A pesar de su amplia utilización, aún no se conocen con certeza los mecanismos por los cuales esta técnica es eficaz. Este hecho, ha dado pie a la especulación y formulación de teorías que aun habiéndose descartado a través de estudios científicos, siguen siendo de amplio uso dentro del ámbito clínico.

Cada vez son más las voces que se alzan advirtiendo de los posibles efectos adversos del uso de estas técnicas. Algunos autores dudan de que sea una técnica inocua, basándose para ello en los hallazgos de lesiones histológicas en los estudios en cadáveres.

El objetivo general de esta tesis fue analizar y estudiar los posibles mecanismos por los que la técnica es eficaz (artículos I y II) y si la técnica en si puede producir daños en los tejidos (artículo III). Esto se realizará a través del análisis plasmático de neuropéptidos relacionados con la analgesia y de marcadores de daño tisular.

Los principales resultados de la tesis sugieren que en sujetos sanos: a) La aplicación de una manipulación vertebral cervical produce un incremento significativo de la concentración plasmática de neurotensina, oxitocina, cortisol y sustancia P. b) La aplicación de una manipulación vertebral torácica produce un incremento significativo de la concentración plasmática de neurotensina y oxitocina. c) La aplicación de una manipulación vertebral cervical o torácica, no produce cambios significativos en la concentración plasmática de óxido nítrico. d) La aplicación de una manipulación vertebral cervical produce un incremento significativo de los umbrales de dolor a la presión locales (sobre la proyección de la articulación cigapofisaria C5-C6 y sobre el epicóndilo lateral). d) La concentración de sustancia P previa a la manipulación cervical es directamente dependiente de los cambios que se producen en los umbrales de dolor a la presión tras la intervención de una manera positiva. e) La aplicación de una manipulación vertebral cervical o torácica no produce cambios significativos en la concentración plasmática de creatinfosfoquinasa, lactato deshidrogenasa, proteína C reactiva, enolasa neuro-específica, aldolasa, troponina o mioglobina.

En síntesis, los resultados de la presente tesis Doctoral muestran que el empleo de una manipulación vertebral tanto cervical, como torácica, sobre sujetos sanos conlleva la liberación de sustancias químicas que pueden relacionarse con mecanismos inhibitorios descendentes del dolor, pudiendo ser éste uno de los mecanismos que explican los efectos analgésicos asociados a la manipulación vertebral. También se han obtenido datos que indican que en sujetos sanos, el uso tanto de una manipulación cervical como de una manipulación torácica, no parece generar un estrés mecánico lo suficientemente severo para suscitar. Estos hallazgos parecen indicar que los efectos adversos asociados a la manipulación vertebral no tienen su base en lesiones histológicas, si no en sistemas complejos del procesamiento de la información o en procesos patológicos previos del paciente.

Terapeutas capacitados para el uso de las manipulaciones vertebrales deben de sopesar los costes y los beneficios en cada paciente sobre el cual se vaya a aplicar la técnica con el fin de minimizar los posibles efectos adversos asociados a la manipulación vertebral y maximizar su papel antinociceptivo y analgésico.

Palabras clave: manipulación vertebral. Concentración plasmática de químicos. Umbrales de dolor a la presión. Analgesia y antinocicepción. Efectos adversos.

ABREVIATURAS

ACI	Arteria Carótida Interna
ACV	Accidente Cerebrovascular
AINES	Antiinflamatorios no Esteroideos
ATP	Adenosín Trifosfato
AV	Arteria Vertebral
AVB	Arteria Vertebrobasilar
CPK	Creatinfosfoquinasa
ECA	Estudio Controlado Aleatorizado
EMG	Electromiografía
EMT	Estimulación Magnética Transcraneal
ENS	Enolasa Neuro-Específica
EVA	Escala Visual Analógica
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MV	Manipulación Vertebral
MVC	Manipulación Vertebral Cervical
MVL	Manipulación Vertebral Lumbar
MVT	Manipulación Vertebral Torácica
NT	Neurotensina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Oxido nítrico
OT	Oxitocina

PCR	Proteína C Reactiva
PME	Potencial Motor Evocado
RM	Rango de Movimiento
SGPA	Sustancia Gris Periacueductal
SNC	Sistema Nervioso Central
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SP	Sustancia P
UDP	Umbral de Dolor a la Presión

INTRODUCCIÓN

La fisioterapia es una disciplina cuya finalidad es la disminución de la percepción de dolor por parte del paciente y la mejora o el mantenimiento de la función. Para cumplir con estos objetivos la fisioterapia dispone de una gran variedad de técnicas, entre las cuales se encuentran las técnicas manuales. Dentro de las técnicas manuales, las técnicas articulares son de amplia utilización. Estas técnicas, pueden ser de baja velocidad y gran amplitud de recorrido, o de alta velocidad y corta amplitud de recorrido. Las técnicas de alta velocidad y corta amplitud, son comúnmente denominadas; manipulación.

1 CONCEPTO DE MANIPULACIÓN VERTEBRAL

La manipulación vertebral (MV) es una técnica que ha sido utilizada desde tiempos remotos por “recolocadores de huesos”, curanderos, chamanes, barberos y practicantes. Hipócrates (400 AC) escribió sobre su valor en el tratamiento de las "mal posiciones" vertebrales. Así mismo, existen datos de la utilización de la MV en China y Grecia, ya en el periodo que comprende 2700-1500 AC. Hoy en día la MV es utilizada por fisioterapeutas, quiropractores, osteópatas y médicos¹ como parte importante del tratamiento y manejo en pacientes con dolor de origen musculoesquelético, sobre todo en las fases agudas y subagudas de dichos proceso²⁻⁵.

A pesar de ser una técnica ampliamente utilizada por diversos terapeutas, sigue sin haber una definición consensuada entre los distintos profesionales, lo que hace que el propio concepto de MV siga en revisión⁶. Gatterman en 1994 define la MV como un procedimiento manual en el cual se realiza un movimiento de alta velocidad y corto recorrido con la finalidad de mover a la articulación más allá de su rango de movimiento (RM) fisiológico sin exceder los límites anatómicos de dicho RM⁷.

2 EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN VERTEBRAL

La manipulación ha sido documentada como beneficiosa en el tratamiento del cuello y de la espalda⁸. Existe numerosa evidencia de la eficacia de la utilización de la manipulación en la región cervical para el tratamiento del dolor de origen musculoesquelético en el cuello^{5,9,10}. No obstante, numerosos clínicos expertos en el tratamiento manual del dolor de cuello destacan la importancia del examen y del

tratamiento de la columna dorsal en pacientes con dolor de cuello, ya que en sí misma, la relación biomecánica intrínseca existente entre la columna cervical y la columna dorsal podría ser un factor contribuyente del dolor y de la disfunción de la región del cuello. También habría que tener en cuenta que la literatura científica previene de las intervenciones cervicales al final del RM así como, del uso de la manipulación vertebral cervical (MVC) por el riesgo, aunque bajo, de efectos adversos¹¹. Toda esta información podría señalar a la manipulación vertebral torácica (MVT) como una alternativa eficaz a la manipulación cervical en el tratamiento del dolor mecánico cervical.

En la actualidad, encontramos varios trabajos de relevancia que nos hablan de los beneficios de añadir una MVT al tratamiento del dolor cervical. Por ejemplo, Cleland y cols.¹² en un ensayo clínico aleatorizado compararon la MVT con una MVT fingida en pacientes con dolor de cuello. El grupo que recibió la MVT mostró mejoras inmediatas claramente superiores en la intensidad del dolor. En la misma línea, en 2007 otro ensayo clínico aleatorizado, Cleland et al.¹³ mostraron como la MV aplicada a la región dorsal alta y media, produjo mayor reducción de dolor y discapacidad que la movilización pasiva de baja velocidad aplicada a la columna dorsal en pacientes con dolor cervical subagudo. Igualmente, González-Iglesias et al.^{14,15} examinaron la efectividad de añadir la MVT a un tratamiento de termoterapia superficial y electroterapia analgésica en el manejo del dolor cervical agudo, encontrando en ambos ensayos mejoras significativas en el grupo de la MVT en términos tanto de dolor como de discapacidad. En una revisión sistemática reciente, Cross et al.¹⁶ concluyen que la MVT es eficaz en el manejo del dolor cervical agudo y subagudo. En el año 2011 se ha publicado el primer ensayo en una muestra de pacientes con dolor cervical crónico¹⁷ obteniéndose mejoras significativas tanto en la función, como en la percepción del dolor. Así, el uso de la MV con la finalidad de disminuir el dolor y la discapacidad en los pacientes está recogido en numerosas guías de práctica clínica¹⁸⁻²¹.

A pesar de que la MV es una técnica ampliamente utilizada, y que la literatura consultada respalda el uso de la MV en el tratamiento del dolor y la disfunción de origen musculoesquelético, aun no se conocen con exactitud los mecanismos neurofisiológicos a través de los cuales se puede justificar la efectividad de dicha técnica²². Numerosos investigadores han tratado de arrojar luz sobre esta cuestión, pudiéndose observar dos líneas o corrientes de investigación. Investigadores que buscan medir cambios en la función que se pueden justificar como cambios biomecánicos y en

el control motor, como es el aumento del RM; e investigadores que buscan determinar el impacto que la MV tiene sobre la percepción del dolor.

2.1 Cambios en la función

En la actualidad, cada vez con más frecuencia los estudios que intentan arrojar luz sobre aspectos relacionados con la patología de origen musculoesquelético se centran en valorar el efecto que esta tiene sobre la función. Valorar cambios en la función hace posible estimar el potencial efecto que la MV tiene en el tratamiento de dicha patología. Con esta finalidad se utilizan diversos cuestionarios como el Neck Disability Index, pruebas funcionales como el test de flexión craneocervical para la musculatura flexora profunda cervical, o la valoración del movimiento fisiológico uniplanar tanto pasivo como activo a través de un goniómetro.

2.1.1 Cambios en el Rango de Movimiento

El uso de la evaluación del movimiento fisiológico, tanto activo como pasivo de la columna cervical, en los pacientes que presentan dolor en la región cervical y/o cérvico-dorsal, forma parte integral de la exploración. Su registro permite tener un dato objetivo a través del cual se puede valorar la magnitud de la disfunción del paciente y del efecto del tratamiento. Tanto es así que la Guía de la Asociación de Médicos Americana para la evaluación de la discapacidad permanente, cataloga esta medición como un componente importante de la evaluación²³. Dall'Alba et al.²⁴ en un estudio comparativo, fueron capaces de discriminar entre sujetos con latigazo cervical (dolor y discapacidad moderados) y sujetos sanos utilizando como único dato la magnitud del RM. Así mismo, Rudolfsson et al.²⁵ determinaron a través de un estudio transversal, que los sujetos con dolor cervical crónico tienen una limitación significativa del RM. Parece ser que en los estudios sobre dolor cervical de origen musculoesquelético, el uso del RM es la forma de medición objetiva más utilizada, afirmación avalada por varias revisiones sistemáticas²⁶⁻²⁸.

En una revisión sistemática reciente, Cross et al.¹⁶ concluyen que la MV aumenta el RM tanto en pacientes con dolor cervical mecánico agudo, como subagudo. Martínez-Segura et al.²⁹ en un estudio controlado aleatorizado (ECA) obtuvieron un aumento significativo del RM cervical tras una MVC. Dunning et al.³⁰ en un estudio clínico aleatorizado multicentro reciente también obtuvieron un aumento del RM cervical, tanto al realizar una MVT, como una MVC.

2.2 Cambios en la percepción del dolor

2.2.1 Elementos de medida

En la historia clínica del paciente, uno de los datos más relevantes para el fisioterapeuta es la percepción de dolor por parte del paciente, ya que es el motivo de consulta más frecuente dentro del ámbito de la fisioterapia³¹. Para intentar objetivar una experiencia tan subjetiva, los clínicos se ayudan de pruebas sensoriales cuantitativas como la sensibilidad al dolor por presión mecánica medida con algometría o escalas visuales analógicas (EVA), entre otras.

2.2.1.1 *Algometría*

La determinación de los umbrales de dolor a la presión (UDP) es una de las modalidades más ampliamente utilizadas en la literatura científica para objetivar los cambios en la percepción del dolor tras el uso de una intervención sobre un paciente. El UDP es definido según la Asociación Internacional para el Estudio de Dolor (1986), como la menor intensidad de estímulo a la presión en la cual un sujeto percibe el dolor³². La determinación de los UDP a través de un algómetro de presión es una técnica de medida de la sensibilidad mecánica de los tejidos periféricos que ha mostrado una excelente reproducibilidad y validez en sujetos sanos³³, además de una buena fiabilidad intraobservador³⁴. Al revisar la literatura científica, son numerosos los artículos publicados que hacen referencia a cambios en los UDP como consecuencia de una MV tanto en sujetos asintomáticos³⁵⁻³⁸, como en sujetos con dolor^{9,39-41}.

2.2.1.2 *Otras formas de valoración*

La literatura científica recoge diversos métodos de medición del efecto de la MV sobre la percepción del dolor como las EVA^{9,30,42} o la determinación del tamaño del campo receptivo doloroso⁴³.

2.2.2 Mecanismos inhibitorios del dolor

2.2.2.1 *Mecanismos inhibitorios segmentarios*

Históricamente se ha descrito que una parte de los mecanismos neurofisiológicos que forman parte de las respuestas de analgésica asociadas a la manipulación parecen estar justificados mediante la teoría del umbral de la compuerta descrita por Melzack²². En esta teoría los autores postularon que los estímulos propioceptivos procedentes de

las fibras A β , de tacto discriminativo, tienden a inhibir la transmisión nociceptiva (cierran la compuerta) en el asta dorsal de la médula espinal, mientras que la actividad en las fibras nociceptivas A δ y C tiende a facilitar dicha transmisión (abren la compuerta)⁴⁴. Ihdahl et al.⁴⁵ en un modelo animal, observaron cómo la estimulación de los propioceptores capsulares de una articulación cigapofisaria disminuye el reflejo paraespinal asociado a la estimulación nociceptiva de la cápsula. Así mismo, Malisza et al.⁴⁶ en otro modelo animal, encontraron evidencia de mecanismos inhibitorios segmentarios asociados al uso de terapia manual. Tanto el grupo de George⁴⁷, como el de Bialosky⁴⁸ concluyeron que, en sujetos sanos, el efecto antinociceptivo observado tras una MV es atribuible al asta dorsal de la médula.

2.2.2.2 Mecanismos inhibitorios descendentes

La literatura científica aporta datos sobre la influencia que tienen estructuras supraespinales sobre el dolor (corteza anterior cingulada, amígdala, sustancia gris periacueductal (SGPA) y la región rostral ventromedial del bulbo raquídeo)⁴⁹. Las investigaciones más recientes orientan a que los mecanismos centrales de modulación descendente del dolor parecen ser los principales sistemas fisiológicos involucrados en las respuestas de analgesia inmediata observadas tras la manipulación. Malisza et al.⁵⁰ en un modelo realizado en ratas, determinaron a través de resonancia magnética funcional las áreas cerebrales que se activaban como consecuencia del dolor producto de una infiltración de capsaicina. Estos autores, observaron cómo, tras una movilización articular de baja velocidad, disminuye la activación de las áreas cerebrales previamente relacionadas con dolor. Estos resultados proporcionan confirmación directa de mecanismos inhibitorios descendentes. Vicenzino et al.⁵¹ en sujetos con epicondilitis lateral sometidos a movilizaciones articulares de baja velocidad de la columna cervical observaron cambios en la percepción del dolor y el sistema nervioso simpático (SNS) y que estos cambios se correlacionaban, lo cual parece sugerir que parte de los efectos atribuidos a la movilización articular de baja velocidad se deben a mecanismos moduladores centrales.

En la MV, estos mecanismos centrales difusos también se confirman al observar cómo la manipulación dirigida a un segmento diagnosticado como hipomóvil no es más beneficiosa que la manipulación realizada sobre un segmento elegido al azar, o que diversos estudios recientes hayan mostrado cambios en la percepción de dolor en

regiones a distancia del área que se trató¹². Numerosos autores han defendido esta hipótesis de modulación descendente como el mecanismo responsable de la analgesia inmediata producida tras la MV. Más concretamente, Skyba et al.⁵² sugirieron que el efecto de la MV es una forma de analgesia no opioide dependiente, mediada por receptores espinales serotoninérgicos y noradrenérgicos que utilizan vías inhibitorias descendentes, “neuronas off”, desde la SGPA, vía bulbo raquídeo rostral ventromedial y tegmento pontino dorsolateral, hasta el asta dorsal de la medula.

2.2.3 Factores contribuyentes a la modificación de la percepción del dolor

2.2.3.1 *Modificación del sistema motor reflejo*

La perpetuación de la percepción del dolor se puede justificar por múltiples mecanismos. Uno de ellos es el mantenimiento del ciclo dolor/espasmo/dolor. Diversos autores defienden la hipótesis de que una de las claves del éxito de la MV, reside en una inhibición motora refleja, la cual rompería este ciclo de dolor/espasmo/dolor^{51,53}.

A pesar de la observación de cambios reflexógenos en el sistema motor asociados a la MV, y de la cantidad de clínicos que se basan en esta premisa para justificar parte de sus efectos objetivables, no existe consenso acerca de su potencial efecto inhibitorio o excitatorio reflejo sobre el sistema motor. Para valorar el efecto motor, se han utilizado diversos métodos:

- La electromiografía (EMG) se utiliza para evaluar y registrar la actividad eléctrica muscular, de manera que detecta las diferencias de potencial eléctrico de las fibras musculares al contraerse. Al revisar los cambios en la EMG que se producen tras una MV, en la literatura científica observamos una tendencia clara a la modificación en la señal electromiográfica. No obstante, parece que no existe consenso en si la modificación comparte una disminución o un aumento de dicha señal. Numerosas investigaciones avalan un aumento de la señal electromiográfica^{41,54-56}, mientras otras avalan una disminución de dicha señal^{38,57-60}.

- El reflejo Hoffman tiene como finalidad determinar la competencia de la médula espinal a través de la estimulación eléctrica del músculo, y ha sido ampliamente utilizado para valorar de forma mínimamente invasiva la competencia del sistema nervioso. De esta manera nos permite valorar cambios en la excitabilidad de las neuronas espinales y corticoespinales. Fryer et al.⁶¹ en un estudio reciente con sujetos

asintomáticos, controlado y aleatorizado, de diseño cruzado, observaron una disminución significativa del reflejo Hoffman tras una MV, situación que se correlaciona con una disminución de la actividad a nivel espinal, produciéndose una disminución significativa de la excitabilidad de la motoneurona alfa, lo que se traduce en una disminución del tono. El grupo de Dishman et al.^{57,60,62,63} han obtenido resultados similares.

– La estimulación magnética transcraneal (EMT) es un método no invasivo para estimular eléctricamente el córtex cerebral y poder valorar la excitabilidad del córtex motor y del tracto corticoespinal⁶⁴, de manera que nos permite estudiar los efectos de los inputs corticoespinales sobre la excitabilidad de la motoneurona alfa⁵³. Los potenciales que genera la EMT son referidos como potenciales motores evocados (PME). La amplitud de estos PME en el músculo diana, refleja cambios en la excitabilidad de células corticomotoneurales y cambios en la excitabilidad de la motoneurona alfa. Dishman et al.⁶⁵ valoraron cambios a nivel central de la excitabilidad motora tras una MV a través de EMT, observándose un aumento significativo de la excitabilidad de la motoneurona alfa desde mecanismos postsinápticos.

Una explicación de estas discrepancias de resultados en las mediciones de las ondas H o de los PME, puede ser la diferencia metodológica de ambos procesos. No obstante, algunos autores advierten que tras una facilitación central existe la posibilidad de desencadenar una disminución de la actividad de las motoneuronas periféricas⁵³.

2.2.3.2 Modificación de la actividad del Sistema Nervioso Simpático

Las respuestas que sugieren modificación en la actividad del SNS ante estímulos aferentes no nocivos, han sido observadas tanto en investigaciones realizadas en animales como en seres humanos. Numerosos estudios han evaluado los efectos que la terapia manual tiene sobre el SNS con la finalidad de comprender sus posibles mecanismos de acción. Modificaciones en la actividad del SNS podrían dar información de la compleja respuesta que desde el sistema nervioso central (SNC) se le da a la MV. La medición del ritmo cardiaco y la presión arterial son formas de sencillas medición y ampliamente utilizadas para la valoración del impacto de una técnica sobre el SNS. Otras formas utilizadas han sido la medición de cambios en la conductancia y de la temperatura de la piel. En un ECA reciente, La Touche et al.⁶⁶ demuestran que tras una movilización de baja velocidad y gran amplitud de recorrido anteroposterior de la

región cervical superior, se produce un aumento significativo de la excitabilidad del SNS. Para valorar la respuesta del SNS estos autores realizaron mediciones de la conductancia y la temperatura de la piel, así como el ritmo respiratorio y cardiaco, obteniendo un incremento significativo tanto de los ritmos respiratorio y cardiaco, como de la conductancia dermal. Del mismo modo, Sterling et al.⁶⁷ observaron un aumento de la excitabilidad del SNS, determinado por un aumento de la conductancia dermal y un descenso de la temperatura de la piel, al realizar una movilización de baja velocidad y gran amplitud de recorrido posteroanterior de la región cervical baja. En otro ensayo clínico, Vicenzino et al.⁵¹ observan resultados similares en sujetos con epicondialgia lateral crónica que fueron sometidos a movilizaciones rítmicas cervicales. Una revisión sistemática reciente (2014)⁶⁸ concluye que la movilización de baja velocidad y gran amplitud de recorrido tiene como respuesta un incremento de la excitabilidad del SNS independientemente del segmento movilizado.

Harris y Wagnon⁶⁹ en su estudio con una muestra de 196 sujetos observaron un aumento de la temperatura de la piel de la yema de los dedos tras una manipulación vertebral lumbar (MVL), o una MVC. Así mismo, observaron un descenso de la temperatura de la yema de los dedos tras una MVT. Debido a estos resultados, estos autores concluyen que la MV tiene efectos sobre el SNS, y que estos efectos dependen del segmento que es diana de la técnica.

A pesar de que la mayoría de las publicaciones sobre este tema avalan el aumento de la excitabilidad del SNS como consecuencia de la terapia manual, Knutson⁷⁰ en un ECA, encontró un descenso significativo de la presión sistólica tras una MVC. Otra muestra de divergencia en los resultados obtenidos tras una MVC la tenemos en el estudio de Nansel et al.⁷¹ donde estos autores no encontraron ningún efecto significativo sobre la presión arterial o el ritmo cardiaco.

Finalmente, Vicenzino et al. proponen que tras una MV el efecto excitatorio del SNS y la analgesia inmediata observada se relacionaban de forma significativa⁷² lo que sugiere un papel directo del SNS en la modulación del dolor.

2.2.3.3 Respuestas de estrés

La evidencia científica pone de manifiesto que el estrés puede producir efectos analgésicos a través de la activación de mecanismos inhibitorios endógenos del dolor⁷³. La activación de estos mecanismos es dependiente de la magnitud y la duración del estímulo estresor al cual es sometido el sujeto de tal manera que, los sujetos expuestos a situaciones estresantes leves, activan sistemas moduladores descendentes basados en la activación del sistema opioide endógeno, mientras que los sujetos expuestos a situaciones de gran estrés, activan sistemas moduladores descendentes no opioides⁷⁴. También se ha observado que ante una situación de gran estrés la magnitud del tiempo a la que el sujeto queda expuesto, parece también determinante a la hora de determinar si la respuesta inhibitoria será opioide dependiente o no. Así, estímulos estresantes intermitentes promueven la activación de los sistemas inhibitorios descendentes opioides dependientes^{75,76}, mientras que los estímulos estresantes que se mantienen en el tiempo promueven los sistemas inhibitorios descendentes no opioides^{73,76}. Esta analgesia inducida por el estrés es de suma importancia para la supervivencia del individuo, ya que es generada intrínsecamente en momentos críticos evitando que el dolor pueda distraer al sujeto. Es decir, la atención se centra más en la amenaza que en el dolor.

El cortisol es una hormona esteroidea que se ha correlacionado de forma positiva con la magnitud de estrés. Diversos estudios han intentado relacionar la terapia manual con cambios en la concentración de cortisol. En un estudio reciente en sujetos sanos realizado por Lindgren et al. se observó un descenso significativo de los niveles de cortisol en saliva tras cinco minutos de masaje⁷⁷. Este dato está en concordancia con varias revisiones^{78,79}. Moraska et al. en su revisión concluyen que una sesión de masaje produce una reducción significativa de los niveles de cortisol salivar, y que este efecto se reproduce con cada sesión. No obstante, parece ser que el efecto no se mantiene en el tiempo, ni es acumulable.

En un estudio en sujetos sanos realizado por Whelan et al.⁸⁰ no se encontraron cambios significativos en los niveles de cortisol en saliva tras una MV. Este resultado está en concordancia con los resultados obtenidos por Tuchin PJ⁸¹

La literatura revisada parece indicar que la terapia manual no tiene un efecto estresante sobre los sujetos y que el efecto analgésico asociado a la MV no parece ser

dependiente de mecanismos inhibitorios descendentes basados en una respuesta de estrés.

2.2.3.4 Modificación de la concentración de químicos en el medio interno

Existen una gran variedad de mediadores químicos relacionados con el dolor. Algunos de estos mediadores son secretados desde el SNC con una finalidad analgésica o de control descendente del dolor, además de tener un papel de diversa importancia sobre el SNS (noradrenalina y acetilcolina) o la respuesta de estrés (cortisol). Diversos autores han estudiado con anterioridad el impacto que tiene la MV sobre la producción de ciertos químicos. Vernon et al.⁸² observaron un aumento significativo de los niveles sanguíneos de β -endorfinas a los 5 minutos tras una MVC. Sin embargo, Sanders et al.⁸³ no encontraron cambios significativos en la concentración de β -endorfinas tras una MVL. Así mismo, Christian et al.⁸⁴ tampoco observaron diferencias significativas en la concentración sanguínea de β -endorfinas tras una MVT o una MVC tanto en sujetos asintomáticos, como sintomáticos.

Por otro lado, Nansel et al.⁷¹ estudiaron el efecto de una MVC sobre la concentración de catecolaminas, no observando cambios significativos tras la intervención.

Teodorczyk-Injeyan et al.⁸⁵ estudiaron el efecto de una MVT sobre la producción de citoquinas proinflamatorias, observando una disminución significativa de la síntesis de las mismas tras la intervención. En una línea parecida, Roy et al.⁸⁶ observaron en sujetos con dolor lumbar crónico una tendencia a la normalización de interleukina 6 y proteína C reactiva al someterse a una MVL.

3 QUÍMICOS CON UN PAPEL ANTINOCICEPTIVO ANALIZADOS EN LA PRESENTE TESIS

Diversos mediadores químicos secretados en sangre han sido relacionados tanto con la nocicepción, como con la antinocicepción. De hecho, alguno de estos químicos tienen un rol dual dependiente de la concentración y del contexto en el que se produce su secreción.

3.1 Sustancia P

La sustancia P (SP) es un neuropéptido que se ha relacionado con la proliferación celular, la producción de citoquinas, la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular⁸⁷. Estas respuestas proinflamatorias son causa de inflamación neurogénica, la cual está asociada a la nocicepción y a la hiperalgesia⁸⁸. Larson et al.⁸⁹ en su estudio advierten del papel pro-nociceptivo de la SP en sujetos con síndromes de dolor crónico como la fibromialgia, de manera que la SP contribuiría a la sensibilización del asta dorsal, reduciendo los umbrales de dolor de estos sujetos.

También se ha observado que la SP tiene propiedades antinociceptivas, de hecho se ha observado que tiene un potente efecto analgésico de larga duración al ser administrada intraperitonealmente e intracranealmente en ratas^{90,91}. Diversos autores, sostienen que la SP puede actuar sobre la lamina V del asta dorsal produciendo un efecto inhibitorio, de manera que se produzca un efecto analgésico sobre el procesamiento de la señal nociceptiva^{92,93}. Nakatsuka et al.⁹² interpretan este hecho como un mecanismo de feed-forward inhibitorio de la actividad del asta dorsal, concluyendo estos autores que la SP tiene un papel fundamental en el reclutamiento de actividad inhibitoria para el procesamiento de la nocicepción. La relación entre la concentración de SP y las terapias manuales sigue siendo controvertida, mientras al masaje se le otorga un papel en la disminución de la concentración de SP en sujetos con fibromialgia⁹⁴, en la MV se observan incrementos de la concentración de SP⁹⁵ o ausencia de cambios en dicha concentración⁸⁵. Estas discrepancias pueden ser fruto de diferencias metodológicas.

3.2 Neurotensina

La neurotensina (NT), es un neuropéptido con un amplio rango de acciones entre las cuales está la antinocicepción⁹⁶. Esta afirmación se sustenta anatómicamente por la alta densidad de receptores de NT localizados en la SGPA y la región rostral ventromedial del bulbo raquídeo, ambas estructuras implicadas en mecanismos descendentes. Además, un estudio realizado por Williams et al.⁹⁷ realizado con microdiálisis en ratas, mostró que la NT era liberada de forma endógena en la SGPA al provocar una lesión inflamatoria. La NT, al igual que en la MV, tiene un efecto analgésico independientes de la naloxona de manera que este efecto no es opiáceo dependiente. Este efecto antinociceptivo se ha corroborado al inyectar el neuropéptido en varias áreas cerebrales⁹⁸. Así mismo la liberación de este neuropéptido parece jugar un papel importante en la analgesia que se le atribuye a la electroacupuntura⁹⁹.

3.3 Oxitocina

La oxitocina (OT), es un neuropéptido el cual desarrolla un potente control antinociceptivo al regular de forma tónica a la SGPA, al núcleo central de la amígdala y al núcleo del rafe magnus¹⁰⁰. Ante estímulos nociceptivos, se ha observado su liberación en la médula espinal desde proyecciones descendentes del eje hipotálamo-hipofisario. Este efecto analgésico es ejercido a través de incrementar la liberación de péptidos opioides como leucina-enkefalinas, metionina-enkefalinas o beta-endorfinas en la SGPA¹⁰¹. Además de su efecto positivo sobre la tasa de secreción de péptidos opioides, recientemente se ha demostrado que esta acción antinociceptiva está mediada en parte, por un incremento de la inhibición sináptica de las láminas más superficiales de la médula espinal¹⁰². Un estudio reciente realizado por Morhenn et al¹⁰³ ha mostrado incrementos significativos en la concentración sanguínea de OT tras 15 minutos de masaje con una intensidad moderada.

Aparte de los efectos antinociceptivos, la OT puede producir efectos "antiestrés" como la disminución de la presión arterial y de los niveles de cortisol, y promueve el crecimiento y reparación de los tejidos¹⁰⁴. También se ha observado que la administración de OT en ratas induce un efecto antiinflamatorio¹⁰⁵.

3.4 Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es una pequeña molécula considerada como el mayor vasodilatador local¹⁰⁶. Se trata de un gas con la capacidad de difundir, y que reacciona rápidamente con el oxígeno para formar derivados de sí mismo como son el nitrito y el nitrato¹⁰⁷. Esta pequeña molécula tiene dos papeles de gran importancia, por un lado media en la supervivencia celular¹⁰⁸, y por otro en la nocicepción¹⁰⁹. Luo y Cizkova en una revisión sistemática reciente advierten del efecto beneficioso de la liberación de pequeñas cantidades de ON durante la inhibición de las vías nociceptivas¹¹⁰. No obstante, Aley et al. en un modelo animal concluyen que la liberación de ON contribuye a la hiperalgesia¹¹¹. Estos resultados aparentemente contradictorios nos dan una idea del complejo papel que juega el ON en la nocicepción. La liberación de ON por los tejidos endoteliales y las células sanguíneas ha sido demostrada ante estímulos mecánicos fisiológicos como es la puesta en tensión por estiramiento de los tejidos^{112,113}. Su liberación también ha sido demostrada tras la aplicación de diferentes formas de terapia física como son el masaje¹⁰³ o la acupuntura¹¹⁴, pudiendo ser este uno de los mecanismos a través los cuales estas terapias producen efectos analgésicos.

3.5 Cortisol

El cortisol es una hormona esteroidea producida por la glándula suprarrenal en situaciones de estrés¹¹⁵. Su liberación produce disminución de edemas y del dolor a través de la inhibición de las primeras etapas del proceso inflamatorio. Altos niveles de cortisol en sangre promueven la reparación tisular a través de una facilitación de la gluconeogénesis⁸⁰. Determinar los cambios en la concentración de cortisol parece ser un buen indicador de estrés, ya que un estudio realizado por Basset et al.¹¹⁶ demostró una correlación positiva entre los niveles de estrés y la cantidad de cortisol secretado. La concentración de cortisol ha mostrado ser influida por la terapia manual, ya que diferentes estudios han observado una disminución de su concentración tras una terapia manual basada en masaje⁷⁷⁻⁷⁹. No obstante, diferentes estudios parecen indicar que la concentración de cortisol no es influenciada por la MV^{80,81,84}.

3.6 Orexina A

La orexina es un neuropéptido descubierto recientemente (1998) que secretado por el hipotálamo participa de forma importante en la toma de alimentos, la homeostasis energética, los procesos de adicción y búsqueda de recompensa, y la promoción del estado de vigilia¹¹⁷. Se han identificado proyecciones orexinérgicas tanto en la SGPA, como en la lámina I y X del asta dorsal de la médula o el ganglio de la raíz dorsal¹¹⁸⁻¹²¹. Además, se ha localizado el receptor para la orexina A en las fibras C a su llegada a la lámina I¹²².

Existe evidencia del papel de la orexina A en la regulación del procesamiento nociceptivo a través de mecanismos tanto espinales como centrales, ya que la administración intratecal o intraventricular de esta sustancia elimina tanto la alodinia mecánica como la hipersensibilidad térmica en múltiples modelos de dolor^{123,124}. En modelos de dolor neuropático, Jeong and Holden¹²⁵ han mostrado que la orexina ejerce un papel antinociceptivo. Este papel antinociceptivo no parece estar mediado por el sistema opioide, ya que la analgesia derivada de la administración de orexina A no revierte con la naloxona¹²³. En un estudio reciente usando ratones se ha mostrado un incremento significativo de orexina A al aplicar electroacupuntura¹²⁶.

4 EFECTOS ADVERSOS ASOCIADOS A LA MANIPULACIÓN VERTEBRAL

El hecho de que exista evidencia de su eficacia en el manejo de ciertos dolores de origen musculoesquelético, y que en una reciente revisión sistemática se haya establecido una relación coste-beneficio positiva, tanto si se utiliza de forma aislada o asociada a otros tipos de terapia como pueden ser otras formas de terapia manual o ejercicio físico¹²⁷, hace tentadora la idea de que pueda ser el tratamiento de elección en pacientes con dolor de origen musculoesquelético. No obstante, es importante destacar que cada vez son más las voces que se alzan para advertir de que su utilización puede estar asociada a una serie de efectos adversos para la salud del paciente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define un efecto adverso como “cualquier respuesta nociva, no intencionada, que se produce a dosis habituales para la profilaxis, diagnóstico, o tratamiento¹²⁸. Esta definición ha sido tomada prestada del contexto farmacéutico. Nykoliation and Mierau¹²⁹, definen efecto adverso como

“cualquier situación con relación causal probada de una acción o tratamiento que resulta en detrimento del sujeto”.

En la literatura científica, el primer caso documentado de aparición de efectos adversos asociados a la MV se publica en 1907, donde Roberts et al.¹³⁰ describen una fractura-luxación del atlas. Posterior a esta publicación varios estudios de casos y algunos estudios retrospectivos han puesto en entredicho la seguridad de la MV, obteniéndose pruebas de la posible de asociación de efectos adversos a la MV. No obstante, estos efectos adversos rara vez llegan a ser mortales¹³¹⁻¹³³.

Debido a la gran variedad de efectos adversos descritos en la literatura tras una MV, se hace imprescindible una taxonomía que nos permita jerarquizar dichos efectos adversos para poder realizar una valoración más fiable de la relación coste-beneficio asociada al uso de la MV en el tratamiento del dolor y la disfunción de origen musculoesquelético.

En un estudio reciente basado en una modificación del método Delphi, Carnes et al.¹³⁴ llegan a una taxonomía de dichos efectos adversos asociados a la terapia manual, clasificándolos como:

- Efectos adversos mayores o catastróficos: se caracterizan por perpetuarse en el tiempo, pudiéndose observar a medio y largo plazo. La sintomatología asociada puede considerarse entre moderada y severa. Normalmente el propio efecto adverso necesita de tratamiento para su mejora o resolución. Estos autores los consideran como inaceptables y pueden ser causa de invalidez o defunción.
- Efectos adversos moderados: se caracterizan por perpetuarse en el tiempo, pudiéndose observar a medio y largo plazo. La sintomatología asociada se identifica como moderada. Normalmente el paciente requiere de tratamiento para la mejora o resolución del efecto adverso, aunque las consecuencias de estos efectos tienen características autolimitantes en el tiempo.
- Efectos adversos leves: se caracterizan por una sintomatología leve y de corta duración, no considerándose de importancia. La función del paciente no se ve comprometida. Sus efectos son transitorios, no necesitando de tratamiento para su resolución ya que las consecuencias son autolimitantes.

El grueso de la literatura científica que relaciona efectos adversos a la terapia manual hace referencia a efectos adversos producidos por técnicas articulares, más concretamente a MV. En una revisión sistemática reciente, Carnes et al.¹³⁵ estiman la incidencia de efectos adversos leves o moderados tras un tratamiento manual en un 41%, estableciéndose la mayor parte de ellos en las primeras 24 horas tras el tratamiento y resolviéndose a las 48 horas tras el tratamiento. En la misma línea encontramos un estudio prospectivo también reciente que establece que un 48% de los pacientes que reciben MV describen un recrudecimiento de los síntomas o un síntoma nuevo tras una primera intervención, y que hasta un 26% de dichos pacientes refieren algún efecto adverso tras la segunda o tercera intervención. Estos efectos adversos se establecen en las primeras 48 horas tras la intervención en el 90% de los pacientes y son leves a moderados. Los efectos adversos más observados en este estudio son dolor de origen musculoesquelético o efectos relacionados con causas musculoesqueléticas, 75% y 72% respectivamente. También describen efectos adversos que no se relacionan con causas musculoesqueléticas como cansancio, mareo, náuseas o acúfenos en un 19% de los sujetos¹³⁶. Otro estudio prospectivo realizado en Noruega por Senstad et al.¹³⁷ utilizando como muestra 1.058 pacientes y 4.712 tratamientos, establece que el 55% de los sujetos sometidos a MV referirán al menos un efecto adverso. Sin embargo, sólo el 25% de los tratamientos tiene como resultado al menos un efecto adverso, y el 5% más de un efecto adverso. De estos efectos, el 64% tienen comienzo a las 4 horas tras el tratamiento, y de este 64%, el 74% desaparecen dentro de las primeras 24 horas. Tan sólo el 20% de estos efectos tienen comienzo a los 10 minutos del tratamiento. Parece ser que la aparición de estos efectos adversos se relacionan con el género y con la duración de los síntomas, de manera que, las mujeres tienen mayor probabilidad de sufrir un efecto adverso que los hombres, así como pacientes con sintomatología de larga evolución¹³⁸.

Del estudio de Senstad et al. también se obtiene que el 50% de los efectos adversos asociados a la MV se relacionan con molestias locales, de manera que el 35% de los pacientes que refieren efectos adversos serán considerados leves, el 50% moderados, el 14% mayores y el 1% catastróficos. Otros efectos adversos asociados a la MV que describen estos autores fueron cefalea (12%), sensación de cansancio (11%), dolor en otra zona distinta (10%), mareos y náuseas (5%)¹³⁷.

Walker et al.¹³⁹ en un ECA reciente concluyen que el riesgo relativo de padecer un efecto adverso tras una MV es similar al que se obtiene al utilizar un tratamiento

placebo, valorando que una amplia proporción de los efectos adversos experimentados tras un MV puede ser debida al curso natural de la sintomatología del paciente.

Sin duda alguna los efectos adversos mayores y catastróficos descritos en la literatura a pesar de su baja incidencia son una clara llamada de atención para realizar una evaluación del ratio coste-beneficio de la MV haciendo especial hincapié en el análisis de la aparición de efectos adversos mayores. En este sentido, Rubinstein et al.¹³⁶ a pesar de tener una muestra considerable (n=529), no observaron ningún efecto adverso mayor asociado a la MV. También Carnes et al.¹³⁵ obtienen una estimación del riesgo de padecer un efecto adverso mayor asociado a una MV muy bajo, estimando que un 0,01% de los pacientes, o en un 0,007% de los tratamientos tendrá asociado un efecto adverso mayor. Para entender la magnitud del riesgo de sufrir un efecto adverso mayor tras una MV, se hace necesario realizar una comparación con otras formas de terapia. Por ejemplo, se estima que la MVL es 37.000-148.000 veces más segura que el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y 55.500-444.000 veces más segura que la cirugía en el tratamiento de la hernia discal lumbar¹⁴⁰. Así mismo, Fries en 1992, estimó que aproximadamente uno de cada 220 sujetos con dolor de origen musculoesquelético medicados con AINES será hospitalizado por complicaciones gastrointestinales y que uno de cada 2.200 fallecerá por una reacción adversa asociada al consumo de estos¹⁴¹. Aunque la incidencia de aparición de efectos adversos leves tras una MV es alta, realizar una valoración despreciativa del uso de la MV en base a este dato puede ser engañosa, ya que estos investigadores también establecen que el riesgo relativo de padecer un efecto leve a moderado debido a un tratamiento manual es similar al del ejercicio físico, y menor que el de tomar AINES¹³⁵.

A pesar de su amplia utilización a lo largo de la historia, de haber sido documentada como beneficiosa en el tratamiento del dolor de cuello y espalda baja, y de que en las últimas décadas se haya incrementado la frecuencia de su uso¹⁴², son cada vez más los estudios que advierten de que la MV no es una técnica inocua para el paciente y que puede estar asociada a efectos adversos de diversa índole.

4.1 Efectos adversos y Manipulación Vertebral Cervical

En el raquis, la columna cervical es la región que más incidencia tiene de efectos adversos que puedan relacionarse con una MV. En una encuesta realizada en Sudáfrica a fisioterapeutas se observó que el 92% de los efectos adversos que se producen tras una manipulación se relacionaba con la MVC¹⁴³. Eriksen et al.¹⁴⁴ en un estudio multicentro prospectivo estimaron que un 53% de los sujetos sometidos a una MVC alta referirá al menos un efecto adverso.

Con el fin de poder valorar de forma más congruente el riesgo real de la utilización de la MVC vamos a utilizar la taxonomía anteriormente descrita.

4.1.1 Efectos adversos mayores o catastróficos

Al realizar una revisión de la literatura científica, la columna cervical es la región que más casos descritos de la asociación entre MV y efectos adversos severos o catastróficos tiene. Thiel et al. estimaron en base a su estudio prospectivo que el riesgo de padecer un efecto adverso mayor o catastrófico tras una MVC es de 6 cada 100,000 MVC¹¹. De estos efectos adversos, los catastróficos son los que más debate y especulación han producido al poder ser causa de defunción. En la literatura encontramos dos posturas muy enfrentadas. Por un lado, la que advierte del gran peligro que conlleva el uso de esta técnica, y que por lo tanto, debería de evitarse o prohibirse su utilización^{133,145,146}. Por otro, autores que defienden la dificultad para poder correlacionar directamente dichos eventos con la MV, o que defienden que la incidencia de dichos eventos es menor que la incidencia obtenida al usar otros tipos de intervenciones terapéuticas que son de aceptado uso por la comunidad científica^{136,137,147-149}. Entre los efectos adversos catastróficos, los accidentes cerebrovasculares son sobre los que más atención y debate hay.

4.1.1.1 *Accidentes cerebrovasculares*

Numerosos son los procesos fisiopatológicos que pueden llevar a un accidente cerebrovascular (ACV), entre ellos aterosclerosis, una hemorragia secundaria a un aneurisma o a una malformación arteriovenosa, o disección arterial. En la columna cervical, la disección arterial es un término que engloba tanto a la arteria carótida interna (ACI) con a la arteria vertebral (AV)¹⁵⁰. La disección arterial se produce por un desgarramiento de la túnica íntima del endotelio del vaso, pudiendo afectarse o no la túnica media, para que posteriormente el flujo sanguíneo acceda al espacio entre túnicas, lo

que provocará la disección y la producción de un pseudoaneurisma. Posteriormente podrá provocarse un trombo y la estenosis parcial o total del vaso. La MVC y los ACV por disección de la AV o la ACI han sido relacionados desde el informe de Thornton en 1934. Desde entonces, varios estudios han revisado la relación existente entre la MVC y los ACV, estableciéndose un relación de 1 entre 300,000 a 1 entre 5.85 millones de manipulaciones cervicales¹⁵¹. Patijn en 1991 determinó que el 65,1% de todas los efectos adversos catastróficos relacionados con la MVC eran debido a la lesión de la AV¹⁵².

Existe evidencia de que los movimientos en rotación de la columna cervical, sobre todo a finales del RM, estresan más a la AV que los movimiento en flexión lateral de la columna cervical¹⁵³. Numerosos autores, entre ellos Nicolai Bogduk, afirman que las fuerzas de estrés por distensión de dichas arterias al someterse a estos procedimientos pueden ser suficientes para producir la disección de la AV y/o la ACI. No obstante, Symons et al. en un estudio anatómico en cadáveres demuestran que el segmento V3 (tramo entre el foramen de C2 y el codo que realiza la arteria vertebrobasilar (AVB) en C1 para llegar al foramen magno) durante una MVC orientada a los segmentos C2-C4 se estira un 3-5% de su longitud. Este mismo tramo llega a estirarse hasta un 13% en el movimiento cervical en rotación realizado de forma pasiva. Además, estos autores establecen que el fracaso de la íntima de la AVB se produce con fuerzas tensiles de un 58-62%¹⁵⁴. Así mismo, Herzog et al. establecen un estiramiento de un 2% en la ACI durante una MVC, un estiramiento de un 7% al realizar una rotación contralateral, y que la ACI se disecciona con un estiramiento de un 59% de su longitud de reposo¹⁵⁵. Siguiendo estas premisas biomecánicas, Symons et al. discuten la imposibilidad de que las fuerzas a las que se ven sometidas tanto la AVB y la ACI durante una MVC sean suficientes para producir una ACV en un sujeto que no tenga una lesión preexistente (disección prodrómica) o una condición preexistente (enfermedad del colágeno o agenesia de la íntima), y que si la MVC puede desencadenar un ACV, en ese mismo sujeto, los movimientos cervicales normales pueden así mismo desencadenar dicho acontecimiento¹⁵⁶.

Aproximadamente el 80% de los sujetos con disección de la AV y/o de la ACI refieren cefalea occipital intensa y dolor cervical posterior ipsilateral como primeros síntomas¹⁵⁷⁻¹⁵⁹, pudiendo ser estas confundidas con un cuadro de dolor de origen

musculoesquelético. De esta forma, al tratar la columna cervical se puede acelerar el proceso, o incluso un proceso autolimitante transformarse en uno catastrófico.

Según Murphy et al. la evidencia actual parece sugerir que no existe una fuerte fundamentación en una relación causal entre la MVC y los ACV, y que una explicación a los casos de ACV tras MVC puede ser que sujetos que están padeciendo un episodio de ACV acuden al fisioterapeuta para mejorar su cervicalgia o cefalea¹⁵⁰. De manera que tras la visita al fisioterapeuta el ACV sigue su curso natural.

Como consecuencia de la disección de la AV o de la ACI, se puede producir un trombo. El mecanismo, sería un mecanismo fisiológico de reparación del endotelio, donde la agregación plaquetaria daría lugar al trombo¹⁶⁰. La aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares relacionadas con la producción de placas de ateroma se han relacionado con la producción de ACV. A pesar de que en teoría es posible que un émbolo pueda liberarse de una placa arterioesclerótica tras una MVC, no existen pruebas de que se haya dado ningún caso. También son numerosas las voces que postulan cambios degenerativos en la columna cervical como factor precipitante del ACV, al poderse lesionar la AV o la ACI por un osteofito. Sin embargo, Grant en 1994⁷² describió que en 23 de los 26 casos de complicaciones vasculares donde se realizaron radiografías sólo se observaron hallazgos normales o degenerativos leves. Así mismo, Patijin encontró alteraciones radiográficas degenerativas sólo en 9 de los 59 casos de lesión de la AV tras una MVC, pero fueron sólo alteraciones leves y no se observaron osteofitos¹⁵². Además, el hecho de que la edad media de los pacientes en riesgo de ACV por MVC es relativamente baja (30 a 45 años), hace que numerosos autores descarten estos mecanismos como fuentes de un ACV por MVC.

A pesar de las fatales consecuencias de dicho efecto adverso, todavía existe controversia sobre la magnitud del riesgo de sufrir un ACV por causa directa de una MVC alta. Mientras que algunos autores advierten de la fuerte asociación existente entre el uso de estas técnicas y los ACV¹⁶¹, otros sugieren que no existe dicha magnitud de asociación¹⁴⁷.

Cassidy et al. en un estudio poblacional de casos-contróles y casos-cruzados (case-crossover) agrupados dentro de la misma investigación realizada en los hospitales de Ontario desde 1993 hasta 2002 con una población de 109,020,875 personas a lo largo de los 9 años del estudio, encuentra una asociación entre la MVC y los AVC. No

obstante, esta asociación no es distinta a la existente entre visitar un médico general y padecer un ACV. Estos autores discuten como hipótesis la posibilidad de que al no ser posible que los sujetos sufran de un ACV debido al tratamiento del médico general, parece razonable pensar que los sujetos que van al médico general con dolor cervical y/o cefalea y que desarrollan un ACV estaban en el inicio de un ACV y no que la propia intervención produjese la ACV. Al ser las asociaciones similares, estos autores concluyen que no existen un exceso de riesgo de padecer un ACV tras una MVC¹⁶².

En una revisión sistemática reciente llevada a cabo por Haynes et al. se concluye que no existe evidencia de una fuerte asociación entre la MVC alta y el riesgo de sufrir un ACV. No obstante, estos autores también concluyen que no existe evidencia de la falta de asociación entre ambos acontecimientos¹⁴⁸. Esta falta de consenso podría ser explicada por una posible relación causal positiva en sujetos con predisposición a padecer un ACV debido a agenesias de la íntima tanto en la AV como en la ACI, los cuales pueden sufrir un ACV como consecuencia de la lesión de la íntima en actividades de la vida diaria, como pueden ser el ejercicio físico aeróbico o las relaciones sexuales¹⁶³.

En una comunidad de Francia, la incidencia anual de disección espontánea de la ACI se estima en tres por cada 100,000 sujetos¹⁶⁴. Schievink (2001) establece la incidencia anual de disección espontánea de la AV en uno por cada 100,000 a 1.5 por cada 100,000 sujetos¹⁵⁹. Aunque en la actualidad las causas no traumáticas son desconocidas, se especula que puede haber un factor de predisposición genética, asociándose la disección a agenesias del endotelio vascular, así como a enfermedades como el síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV o el síndrome de Marfan^{165,166}. Un dato que parece apoyar un factor genético es el hecho de que aproximadamente el 5% de los sujetos con disección espontánea de la ACI o la AV tienen al menos un miembro en su familia que ha sufrido de un episodio similar¹⁶⁷. Entre los eventos no traumáticos asociados a la disección de estas arterias encontramos eventos triviales como estornudar, vomitar, toser, mantener relaciones sexuales, pintar techos o practicar yoga^{159,163}.

En el 80% de los casos de disección de la AV o de la ACI en los periodos iniciales sólo cursan con una importante cefalea y dolor cervical. Dado lo cual, parece comprensible que esta sintomatología pueda confundirse con sintomatología de origen musculoesquelético y que el uso de una MVC pueda iniciar un embolismo que resulte

fatal, o pueda perpetuar una situación que en principio pudiese ser autolimitante, conduciendo a graves secuelas o muerte¹⁴⁸.

A pesar del gran debate que suscita, y de que son numerosos los autores que apoyan claramente ambas teorías, la mayoría de las revisiones sistemáticas realizadas en la literatura muestran una falta de datos concluyentes con los que afirmar o negar la existencia de una relación causa efecto entre la MV y los ACV¹⁴⁸.

Por último, recordar que para establecer un ratio coste-beneficio más realista, sería adecuado realizar una comparación de incidencias de este tipo de efectos adversos asociados a la MVC, con efectos adversos de índole similar asociados a otros tipos de medidas terapéuticas que se consideran seguras. En una revisión realizada por Dabbs V y Lauretti WJ se concluye que la MVC es varios cientos de veces más seguro en el tratamiento del dolor cervical que el uso de AINES, y que además no existe evidencia que indique que el uso de AINES sea más efectivo que la MVC en el manejo del dolor cervical¹⁶⁸.

4.1.1.2 Parálisis

Otro efecto adverso severo asociado con la MVC sería la pérdida parcial o total de la función motora. Recientemente han sido publicados en prensa y en publicaciones científicas, casos de sujetos que tras someterse a una técnica de MVC han desarrollado algún grado de parálisis en una o varias de sus extremidades¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

4.1.1.3 Hernias Discales

La MVC se ha asociado con el agravamiento o inicio de una hernia discal que precipite el recrudecimiento o el inicio de una radiculopatía o mielopatía cervical¹⁷²⁻¹⁷⁵. A pesar de que en la literatura se describen casos de agravamiento o inicio de radiculopatías o mielopatías cervicales tras un MVC, estos datos están basados en escasos estudios de casos lo que hace difícil establecer una relación causa-efecto y generalizarla. Autores como Murphy y Beres, advierten que es complicada la relación ya que el curso de la afectación del paciente por la que busca el tratamiento puede ser el desencadenante de la radiculopatía o mielopatía¹⁷⁶.

4.1.1.4 Otros

En la literatura científica se describen como efectos adversos mayores asociados a una MVC; fractura cervical (proceso odontoideo)^{130,177}, parálisis diafragmática^{178,179}, síndrome de hipotensión intracraneal¹⁸⁰, hematoma epidural cervical¹⁸¹, pérdida de líquido cefalorraquídeo¹⁸² y problemas oftalmológicos¹⁸³.

4.1.2 Efectos adversos leves y moderados:

La incidencia de efectos adversos moderados se estima en uno de cada 40,000 MV¹⁸⁴. Los efectos adversos no mayores o catastróficos que se correlacionan con la MVC pueden ser de naturaleza musculoesquelética o de naturaleza no musculoesquelética.

4.1.2.1 *Efectos adversos leves y moderados de naturaleza musculoesquelética*

La mayor parte de los efectos adversos leves y moderados que se correlacionan con la MVC son de naturaleza musculoesquelética, siendo de más predominio el recrudecimiento del dolor o la aparición de dolor musculoesquelético referido. Thiel et al.¹¹ en un estudio prospectivo basado en una encuesta nacional entre quiropractores del Reino Unido concluyen que los efectos adversos que se producen pronto tras una MVC son predominantemente de origen musculoesquelético. El efecto adverso más frecuente es el recrudecimiento del dolor cervical (7.3% de los casos). Otros efectos adversos observados por este grupo son: dolor en la extremidad superior (4.8%), disminución de la movilidad del cuello y/o la extremidad superior (3.9%). En la misma línea, en un estudio prospectivo realizado por Eriksen et al.¹⁴⁴ se observa que el 38.1% de los efectos adversos eran de naturaleza musculoesquelética con un valor 3.4 en la escala numérica de dolor de 11 puntos (donde 0 corresponde a ausencia de dolor y 10 a dolor máximo), y sólo el 5.1% de los pacientes refirieron un efecto adverso ≥ 8 en la escala numérica de dolor. Así mismo, estos autores también observan que el 54% de los efectos adversos tuvieron un comienzo dentro de las primeras 24 horas.

4.1.2.2 *Efectos adversos leves y moderados de naturaleza no musculoesquelética*

Numerosos efectos adversos de naturaleza no musculoesquelética se han asociado al uso de la MVC. A pesar de que los efectos adversos de naturaleza simpático refleja parecen predominar, ciertos efectos adversos parecen relacionarse con mecanismos centrales. Thiel et al.¹¹ observaron efectos adversos que pueden

relacionarse con sintomatología de origen neurológica como desvanecimiento (3.9%), vértigos (1.3%) y desorientación (1.1%). Estos autores también encontraron tras 7 días cefalea (4%), parestesias en la extremidad superior (1.5%) y desvanecimiento/vértigo/desorientación (1.3%). Eriksen et al.¹⁴⁴ también apreciaron cansancio (10.4%), dolor irradiado (6.3%), inestabilidad (4.9%) y cefalea (4.2%). Advirtiéndose que síntomas de naturaleza no musculoesquelética como la náusea, el vértigo o la inestabilidad son raros, constituyendo no más del 5% de todos los efectos adversos descritos en la literatura.

4.2 Efectos adversos y Manipulación Vertebral Torácica

La información registrada en la literatura científica que relaciona la MVT con efectos adversos es escasa. Esto puede deberse a una falta de registro de dichos eventos, o a ser una región que debido a sus características anatómicas, la utilización de MV no conlleva la aparición de efectos adversos.

Casi todos los efectos adversos registrados tras una MVT se basan en estudios de casos. Un caso reciente relacionado con un efecto adverso severo es descrito por Struwer et al.¹⁸⁴ donde un varón de 17 años sufrió un hematotórax secundario a una MVT sin la existencia de fracturas vertebrales asociadas. Otro caso de efecto adverso severo tras una MVT es descrito por Masneri et al.¹⁸⁵, y consiste en la aparición de un neumotórax secundario a la utilización de una MVT en una mujer de 20 años. Nykoliatiou y Mierau¹²⁹ describen el caso de una mujer de 32 años con dolor escapulotorácico crónico secundario a una MVT.

4.3 ¿Cómo disminuir la incidencia de los efectos adversos?

Con el fin de disminuir la frecuencia y magnitud de los efectos adversos asociados a la MV, numerosos autores proponen unas pautas a la hora de realizar una MV⁷²:

- No realizar múltiples manipulaciones a lo largo de una sesión. Parece ser que realizar varias intervenciones en una única sesión se asocia con un aumento de la probabilidad de que se produzca un efecto adverso.

- No realizar una MV sin haber determinado previamente los efectos de la movilización articular pasiva de baja velocidad sobre ese segmento. Numerosos autores han puesto en evidencia que algunos sujetos son susceptibles de padecer efectos

adversos tras la utilización de maniobras articulares de baja velocidad. De manera que parece lógico realizar estas maniobras previas a la utilización de una MV ya que con estas maniobras se puede controlar la magnitud de la dosis.

- Realizar una reevaluación del paciente para determinar la eficacia de la MV en la mejora de la sintomatología del paciente y si apareció algún efecto adverso atribuible a ésta que contraindique una nueva exposición a la técnica, o la necesidad de realizarla sobre otra región vertebral.

- Evitar utilizar la MV utilizando un amplio rango de movimiento fisiológico. Para esto se propone utilizar al menos dos movimientos fisiológicos para la puesta en tensión. En la columna cervical superior, evitar las técnicas en rotación pura o rotación más extensión. Klougart et al¹⁸⁶. concluyeron que en los procedimientos basados en rotación de la columna cervical alta se tienen más probabilidad de padecer un efecto adverso moderado a severo, que en los procedimientos sin rotación en esta misma región.

- Evitar las técnicas con un componente de tracción (columna cervical). Ya que este componente pone en mayor estrés el componente vascular.

- Aplicar la MV con la menor cantidad de fuerza necesaria para la consecución del objetivo de la técnica. Tanto Grieve como Bogduk advierten de la relación que existe en los casos publicados de complicaciones por manipulación entre la utilización de fuerza excesiva empleada en la MV y las complicaciones secundarias atribuibles a la MV⁷².

5 MARCADORES DE DAÑO TISULAR

La determinación de biomarcadores de daño tisular ha sido ampliamente utilizada tanto en el ámbito biomédico, como en el ámbito deportivo para poner de manifiesto lesiones tisulares de cualquier tipo. Estos biomarcadores son proteínas o enzimas celulares que normalmente se localizan en el interior de determinadas células, de manera que la detección de estos biomarcadores en plasma se considera clave para poder determinar que dichas células se han disgregado y que por tanto existe lesión histológica. Se conocen una gran variedad de biomarcadores en función del tejido y el tipo de lesión que se quiera detectar. De todas ellas, algunas proteínas como la creatinfosfoquinasa (CPK), la lactato deshidrogenasa (LDH), la aldolasa, la mioglobina

y la troponina han sido ampliamente utilizadas como marcadores de daño tisular al ser detectados a niveles anormales en sangre¹⁸⁷⁻¹⁹¹.

5.1 Creatinfosfoquinasa

La creatinfosfoquinasa (CPK) es uno de los biomarcadores más extensamente utilizados para determinar si existe daño tisular en la musculatura estriada a través de muestras sanguíneas, a pesar de que para la diferenciación entre lesiones histológicas de músculo esquelético y de músculo cardíaco otros parámetros tienen mayor sensibilidad¹⁹². La CPK es una enzima intracelular del metabolismo energético que cataliza la reacción reversible de ceder un fosfato a la creatina para formar creatina fosfato a partir de adenosín trifosfato (ATP).

5.2 Troponina

Se la considera uno de los biomarcadores de daño tisular más adecuado para la diferenciación entre lesiones de músculo esquelético y cardíaco. La Troponina es un complejo proteínico regulador de la función contráctil del músculo estriado que, medida en sus subunidades, permite dicha distinción. Sorichter et al.¹⁹³ concluyeron que la troponina parece ser un biomarcador mejor que la CPK para la determinación de daño tisular del músculo esquelético, siendo utilizada ampliamente en el ámbito deportivo, más concretamente en ejercicios extenuantes¹⁹⁴.

5.3 Mioglobina

La mioglobina es una hemo-proteína presente en el músculo estriado, cuya función es almacenar oxígeno en la célula, a través de una unión reversible con el oxígeno, y transportarlo hasta la mitocondria, jugando un papel importante en el metabolismo aeróbico de la célula. Brancaccio et al.¹⁸⁷ determinaron que la presencia de mioglobina fuera de las células musculares estriadas es de gran valor para determinar la presencia de daño histológico en dichas células.

5.4 Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR) es un biomarcador no específico de inflamación sintetizado por los hepatocitos. Ante infección y/o inflamación, puede aumentarse de forma significativa su producción. En la fase aguda inflamatoria este aumento puede ser de entre 100 y 1000 veces su valor inicial¹⁹⁵. De manera que la PCR es ampliamente

utilizada en la determinación de daño histológico al ser considerada un marcador sensible de inflamación y daño tisular¹⁹⁶.

5.5 Enolasa neuro-específica

La enolasa neuro-específica (ENS), es considerada como el marcador enzimático más específico de daño neuronal¹⁹⁷. La ENS es una isoenzima encontrada en las neuronas tanto centrales como periféricas, observándose una elevación significativa tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo tras una lesión de estas células¹⁹⁸. Se ha encontrado que la ENS tiene un gran valor predictivo de secuelas neurológicas tras un accidente anóxico y que su liberación, tanto plasmática, como en líquido cefalorraquídeo, se correlaciona con la extensión y duración de procesos isquémicos cerebrales^{197,199}.

5.6 Aldolasa

La aldolasa es una enzima glicolítica que desempeña un papel central en el metabolismo energético²⁰⁰. Al ser una enzima citoplasmática, la determinación de los niveles plasmáticos de dicha enzima se utiliza con frecuencia para la determinación de lesiones histológicas.

5.7 Lactato deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que interviene en el metabolismo energético y se haya presente en la mayoría de los tejidos humanos. En la glicolisis anaeróbica, actúa catalizando una reacción redox reversible a través de la cual el piruvato es reducido a lactato, de manera que es esencial para la producción de ATP. También participa en la glucogénesis en tejidos aeróbicos como el corazón, donde el lactato es usado como fuente de energía²⁰¹. Al ser una enzima citoplasmática, la determinación de los niveles plasmáticos de dicha enzima se utiliza con frecuencia para la determinación de lesiones histológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Potter L, McCarthy C, Oldham J. Physiological effects of spinal manipulation: a review of proposed theories. *Phys Ther Rev.* 2005 Sep 1;10(3):163–70.
2. van Tulder MWM, Tuut MM, Pennick VV, Bombardier CC, Assendelft WJJW. Quality of primary care guidelines for acute low back pain. *Spine.* 2004 Aug 31;29(17):E357–62.
3. Assendelft WJ, Morton SC, Emily IY, Suttorp MJ, Shekelle PG. Spinal manipulative therapy for low back pain. A meta-analysis of effectiveness relative to other therapies. *Ann Intern Med. Am Coll Physicians;* 2003;138(11):871–81.
4. Waddell GG. Chiropractic for low back pain. Evidence for manipulation is stronger than that for most orthodox medical treatments. *BMJ.* 1999 Jan 22;318(7178):262–2.
5. Gross A, Miller J, D'Sylva J, Burnie SJ, Goldsmith CH, Graham N, et al. Manipulation or mobilisation for neck pain: A Cochrane Review. *Manual Therapy.* Elsevier Ltd; 2010 Aug 1;15(4):315–33.
6. Evans DW, Lucas N. What is manipulation ? A reappraisal. *Manual Therapy.* Elsevier Ltd; 2010 Jun 1;15(3):286–91.
7. Gatterman MI, Hansen DT. Development of chiropractic nomenclature through consensus. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics.* 1994 Jun;17(5):302–9.
8. Bronfort GG. Spinal manipulation: current state of research and its indications. *Neurol Clin.* 1999 Jan 31;17(1):91–111.
9. Martínez-Segura R. Immediate Changes in Widespread Pressure Pain Sensitivity, Neck Pain, and Cervical Range of Motion After Cervical or Thoracic Thrust Manipulation in Patients With Bilateral Chronic Mechanical Neck Pain: A Randomized Clinical Trial. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2012.
10. Posadzki PP, Ernst EE. Spinal manipulation: an update of a systematic review of systematic reviews. *N Z Med J.* 2011 Aug 11;124(1340):55–71.
11. Thiel HW, Bolton JE, Docherty S, Portlock JC. Safety of chiropractic manipulation of the cervical spine: a prospective national survey. *Spine.* 2007 Sep 30;32(21):2375–9.
12. Cleland JA, Childs MJD, McRae M, Palmer JA, Stowell T. Immediate effects of thoracic manipulation in patients with neck pain: a randomized clinical trial. *Manual Therapy.* 2005 May;10(2):127–35.
13. Cleland JAJ, Glynn PP, Whitman JMJ, Eberhart SLS, MacDonald CC, Childs JDJ. Short-term effects of thrust versus nonthrust mobilization/manipulation directed at the thoracic spine in patients with neck pain: a randomized clinical

- trial. *Physical Therapy* [Internet]. 2007 Mar 31;87(4):431–40. Available from: <http://ptjournal.apta.org/cgi/doi/10.2522/ptj.20060217>
14. González-Iglesias J, Fernández-de-las-Peñas C, Cleland JA, Albuquerque-Sendín F, Palomeque-del-Cerro L, Méndez-Sánchez R. Inclusion of thoracic spine thrust manipulation into an electro-therapy/thermal program for the management of patients with acute mechanical neck pain: A randomized clinical trial. *Manual Therapy*. Elsevier Ltd; 2009 Jun 1;14(3):306–13.
 15. González-Iglesias J. Thoracic Spine Manipulation for the Management of Patients With Neck Pain: A Randomized Clinical Trial. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2008.
 16. Cross KM. Thoracic Spine Thrust Manipulation Improves Pain, Range of Motion, and Self-Reported Function in Patients With Mechanical Neck Pain: A Systematic Review. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2011 Sep.
 17. Lau HMC, Chiu TTW, Lam T-H. The effectiveness of thoracic manipulation on patients with chronic mechanical neck pain - A randomized controlled trial. *Manual Therapy* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Apr 1;16(2):141–7. Available from: <http://pubget.com/site/paper/20813577?institution=>
 18. Childs JD. Neck Pain. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2008 Sep.
 19. McCulloch DK. Non-specific Back Pain Assessment, Management, and Follow-up Guideline. Group Health Cooperative. 2013 Dec 10;:1–14.
 20. Balagué F, Mannion AF, Pellisé F, Cedraschi C. Non-specific low back pain. *Lancet*. 2012 Feb;379(9814):482–91.
 21. Simon Dagenais DC P, PhD ACT, Scott Haldeman DC MP. Synthesis of recommendations for the assessment and management of low back pain from recent clinical practice guidelines. *Spine J*. Elsevier Inc; 2010 Jun 1;10(6):514–29.
 22. Fernández-de-las-Peñas C, Alonso-Blanco C, Cleland JA, Rodríguez-Blanco C, Albuquerque-Sendín F. Changes in Pressure Pain Thresholds Over C5-C6 Zygapophyseal Joint After a Cervicothoracic Junction Manipulation in Healthy Subjects. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2008 Jun;31(5):332–7.
 23. Association AM. Guides to the Evaluation of Permanent Impairment. 1996.
 24. Dall'Alba PTP, Sterling MMM, Treleaven JMJ, Edwards SLS, Jull GAG. Cervical range of motion discriminates between asymptomatic persons and those with whiplash. *Spine*. 2001 Sep 30;26(19):2090–4.
 25. Rudolfsson T, Björklund M, Djupsjöbacka M. Range of motion in the upper and lower cervical spine in people with chronic neck pain. *Manual Therapy*. Elsevier Ltd; 2011 Sep 24;:1–7.
 26. Nordin M, Carragee EJ, Hogg-Johnson S, Weiner SS, Hurwitz EL, Peloso PM,

- et al. Assessment of Neck Pain and Its Associated Disorders. *Spine*. 2008 Feb;33(Neck Pain Suppl):S101–22.
27. Kjellman CV, Skargren E, Oberg B. A critical analysis of randomised clinical trials on neck pain and treatment efficacy. A review of the literature. *Scandinavian journal of rehabilitation medicine*. Stockholm, Sweden, Scandinavian University Press [etc.]; 1999;31(3):139–52.
 28. Strimpakos N. The assessment of the cervical spine. Part 1: Range of motion and proprioception. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*. Elsevier Ltd; 2011 Jan 1;15(1):114–24.
 29. Martínez-Segura R, Fernández-de-las-Peñas C, Ruiz-Sáez M, López-Jiménez C, Rodríguez-Blanco C. Immediate Effects on Neck Pain and Active Range of Motion After a Single Cervical High-Velocity Low-Amplitude Manipulation in Subjects Presenting with Mechanical Neck Pain: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2006 Sep;29(7):511–7.
 30. Dunning JR, Cleland JA, Waldrop MA, Arnot C, Young I, Turner M, et al. Upper Cervical and Upper Thoracic Thrust Manipulation Versus Nonthrust Mobilization in Patients With Mechanical Neck Pain: A Multicenter Randomized Clinical Trial. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2012 Jan;42(1):5–18.
 31. Guide to Physical Therapist Practice. Part 1: A description of patient/client management. Part 2: Preferred practice patterns. American Physical Therapy Association. *Physical Therapy*. 1997 Oct 31;77(11):1160–656.
 32. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain Suppl*. 1986;3:S1–226.
 33. Fischer AA. Pressure algometry over normal muscles. Standard values, validity and reproducibility of pressure threshold. *Pain*. 1987 Jul;30(1):115–26.
 34. Vanderweeen, Oostendorp, Vaes, Duquet. Pressure algometry in manual therapy. *Manual Therapy*. 1996 Nov 30;1(5):8–8.
 35. Fryer, Carub, McIver. The effect of manipulation and mobilisation on pressure pain thresholds in the thoracic spine. *Journal of Osteopathic Medicine*. 2004 Mar 31;7(1):7–7.
 36. Fernández-de-las-Peñas C. Immediate Effects on Pressure Pain Threshold Following a Single Cervical Spine Manipulation in Healthy Subjects. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2007 Jun.
 37. Ruiz-Sáez M, Fernández-de-las-Peñas C, Blanco CR, Martínez-Segura R, García-León R. Changes in Pressure Pain Sensitivity in Latent Myofascial Trigger Points in the Upper Trapezius Muscle After a Cervical Spine Manipulation in Pain-Free Subjects. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2007 Oct;30(8):578–83.

38. Yu X, Wang X, Zhang J, Wang Y. Changes in Pressure Pain Thresholds and Basal Electromyographic Activity After Instrument-Assisted Spinal Manipulative Therapy in Asymptomatic Participants: A Randomized, Controlled Trial. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2012 Jul;35(6):437–45.
39. Fernández-Carnero J, Fernández-de-las-Peñas C, Cleland JA. Immediate Hypoalgesic and Motor Effects After a Single Cervical Spine Manipulation in Subjects With Lateral Epicondylalgia. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2008 Dec 31;31(9):675–81.
40. Fernández-Carnero J, Cleland JA, Arbizu RLT. Examination of Motor and Hypoalgesic Effects of Cervical vs Thoracic Spine Manipulation in Patients With Lateral Epicondylalgia: A Clinical Trial. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2011 Sep;34(7):432–40.
41. Viviane Maduro de Camargo PT DO, Francisco Alburquerque-Sendín PT P, PhD FB, PT VCS, de Souza PT DPR, César Fernández-de-las-Peñas PT DP. Immediate Effects on Electromyographic Activity and Pressure Pain Thresholds After a Cervical Manipulation in Mechanical Neck Pain: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. National University of Health Sciences; 2011 May 1;34(4):211–20.
42. Suvarnato T, Puntumetakul R, Kaber D, Boucaut R, Boonphakob Y, Arayawichanon P, et al. The effects of thoracic manipulation versus mobilization for chronic neck pain: a randomized controlled trial pilot study. *J Phys Ther Sci*. 2013 Jun 30;25(7):865–71.
43. Glover JR, Morris JG, Khosla T. Back pain: a randomized clinical trial of rotational manipulation of the trunk. *Br J Ind Med*. 1974 Jan;31(1):59–64.
44. McMahon SB, Martin Koltzenburg MD. Wall y Melzack Tratado Del Dolor. Harcourt Brace De Espana Sa; 2007. 1 p.
45. Indahl A, Kaigle AM, Reikerås O, Holm SH. Interaction between the porcine lumbar intervertebral disc, zygapophysial joints, and paraspinal muscles. *Spine*. LWW; 1997;22(24):2834–40.
46. Malisza KL, Stroman PW, Turner A, Gregorash L, Foniok T, Wright A. Functional MRI of the rat lumbar spinal cord involving painful stimulation and the effect of peripheral joint mobilization. *J Magn Reson Imaging*. 2003 Jul 21;18(2):152–9.
47. George SZS, Bishop MDM, Bialosky JEJ, Zeppieri GG, Robinson MEM. Immediate effects of spinal manipulation on thermal pain sensitivity: an experimental study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2006;7:68–8.
48. Bialosky JE, Bishop MD, Robinson ME, Barabas JA, George SZ. The influence of expectation on spinal manipulation induced hypoalgesia: An experimental study in normal subjects. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2008;9(1):19.

49. Bialosky JE, Bishop MD, Price DD, Robinson ME, George SZ. The mechanisms of manual therapy in the treatment of musculoskeletal pain: a comprehensive model. *Manual Therapy* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009 Oct 1;14(5):531–8. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19027342&retmode=ref&cmd=prlinks>
50. Malisza KL, Gregorash L, Turner A, Foniok T, Stroman PW, Allman A-A, et al. Functional MRI involving painful stimulation of the ankle and the effect of physiotherapy joint mobilization. *Magnetic Resonance Imaging*. 2003 Jun;21(5):489–96.
51. Vicenzino B, Collins D, Benson H, Wright A. An investigation of the interrelationship between manipulative therapy-induced hypoalgesia and sympathoexcitation. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 1998 Aug 31;21(7):448–53.
52. Skyba DA, Radhakrishnan R, Rohlwing JJ, Wright A, Sluka KA. Joint manipulation reduces hyperalgesia by activation of monoamine receptors but not opioid or GABA receptors in the spinal cord. *Pain*. 2003 Nov;106(1-2):159–68.
53. Dishman JD, Ball KA, Burke J. First prize central motor excitability changes after spinal manipulation: A transcranial magnetic stimulation study. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. Elsevier; 2002;25(1):1–9.
54. Herzog W, Scheele D, Conway PJ. Electromyographic responses of back and limb muscles associated with spinal manipulative therapy. *Spine*. LWW; 1999;24(2):146–52.
55. Harvey M-P, Descarreaux M. Short term modulation of trunk neuromuscular responses following spinal manipulation: a control group study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. BMC Musculoskeletal Disorders; 2013 Mar 13;14(1):1–1.
56. Dunning J, Rushton A. The effects of cervical high-velocity low-amplitude thrust manipulation on resting electromyographic activity of the biceps brachii muscle. *Manual Therapy*. Elsevier Ltd; 2009 Oct 1;14(5):508–13.
57. Dishman JD, Bulbulian R. Spinal reflex attenuation associated with spinal manipulation. *Spine*. 2000 Oct 1;25(19):2519–24–discussion2525.
58. Lehman GJG, McGill SMS. Spinal manipulation causes variable spine kinematic and trunk muscle electromyographic responses. *JCLB*. 2001 Apr 30;16(4):293–9.
59. DeVocht JW, Pickar JG, Wilder DG. Spinal manipulation alters electromyographic activity of paraspinal muscles: a descriptive study. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2005 Sep;28(7):465–71.
60. Dishman JDJ, Bulbulian RR. Comparison of effects of spinal manipulation and massage on motoneuron excitability. *Electromyogr Clin Neurophysiol*. 2001

Feb 28;41(2):97–106.

61. Gary Fryer PhD BSc Osteo ND, Alan J Pearce PhD BSc Spt Sci Hons GD. The Effect of Lumbosacral Manipulation on Corticospinal and Spinal Reflex Excitability on Asymptomatic Participants. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics* [Internet]. National University of Health Sciences; 2011 Oct 25;35(2):86–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161475411002284>
62. Dishman JD, Burke J. Spinal reflex excitability changes after cervical and lumbar spinal manipulation: a comparative study. *Spine J.* 2003 Apr 30;3(3):204–12.
63. Dishman JD, Dougherty PE, Burke JR. Evaluation of the effect of postural perturbation on motoneuronal activity following various methods of lumbar spinal manipulation. *The Spine Journal.* 2005 Nov;5(6):650–9.
64. Ibiricu MA, Morales G. [Transcranial magnetic stimulation]. *An Sist Sanit Navar.* 2009;32 Suppl 3:105–13.
65. Dishman JD, Ball KA, Burke J. First prize central motor excitability changes after spinal manipulation: A transcranial magnetic stimulation study. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics.* Elsevier; 2002;25(1):1–9.
66. La Touche R, Paris-Alemany A, Mannheimer JS, Angulo-Díaz-Parreño S, Bishop MD, Lopéz-Valverde-Centeno A, et al. Does mobilization of the upper cervical spine affect pain sensitivity and autonomic nervous system function in patients with cervico-craniofacial pain?: A randomized-controlled trial. *Clin J Pain.* LWW; 2013;29(3):205–15.
67. Sterling M, Jull G, Wright A. Cervical mobilisation: concurrent effects on pain, sympathetic nervous system activity and motor activity. *Manual Therapy.* 2001 May;6(2):72–81.
68. Kingston L, Claydon L, Tumilty S. The effects of spinal mobilizations on the sympathetic nervous system: A systematic review. *Manual Therapy.* Elsevier Ltd; 2014 Aug 1;19(4):281–7.
69. Harris W, Wagon RJ. The effects of chiropractic adjustments on distal skin temperature. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics.* 1987 Mar 31;10(2):57–60.
70. Knutson GA. Significant changes in systolic blood pressure post vectored upper cervical adjustment vs resting control groups: a possible effect of the cervicosympathetic and/or pressor reflex. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics.* 2001 Jan 31;24(2):101–9.
71. Nansel D, Jansen R, Cremata E, Dhami MS, Holley D. Effects of cervical adjustments on lateral-flexion passive end-range asymmetry and on blood pressure, heart rate and plasma catecholamine levels. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics.* 1991 Sep 30;14(8):450–6.

72. Boyling JD, Jull GA. *Grieve's Modern Manual Therapy*. 2004. 1 p.
73. Parikh D, Hamid A, Friedman TC, Nguyen K, Tseng A, Marquez P, et al. Stress-induced analgesia and endogenous opioid peptides: The importance of stress duration. *European Journal of Pharmacology*. 2011 Jan;650(2-3):563–7.
74. Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology*. 2009 Jul;88(3):184–202.
75. Girardot MN, Holloway FA. Intermittent cold water stress-analgesia in rats: cross-tolerance to morphine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1984 Apr;20(4):631–3.
76. Pavlovic Z, Bodnar RJ. Antinociceptive and hypothermic crosstolerance between continuous and intermittent cold-water swims in rats. *Physiology & behavior*. Elsevier; 1993;54(6):1081–4.
77. Lindgren L, Rundgren S, Winsö O, Lehtipalo S, Wiklund U, Karlsson M, et al. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. Elsevier B.V; 2010 Dec 8;158(1-2):105–10.
78. FIELD T, HERNANDEZ-REIF M, DIEGO M, SCHANBERG S, KUHN C. CORTISOL DECREASES AND SEROTONIN AND DOPAMINE INCREASE FOLLOWING MASSAGE THERAPY. *Int J Neurosci*. 2005 Jan;115(10):1397–413.
79. Moraska A, Pollini RA, Boulanger K, Brooks MZ, Teitlebaum L. *Physiological Adjustments to Stress Measures Following Massage Therapy: A Review of the Literature*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2010;7(4):409–18.
80. Whelan TL, Dishman JD, Burke J, Levine S, Sciotti V. The effect of chiropractic manipulation on salivary cortisol levels. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2002 Mar;25(3):149–53.
81. Tuchin PJ. The effect of chiropractic spinal manipulative therapy on salivary cortisol levels. *Australas Chiropr Osteopathy*. 1998 Jun 30;7(2):86–92.
82. Vernon HT, Dhami MS, Howley TP, Annett R. Spinal manipulation and beta-endorphin: a controlled study of the effect of a spinal manipulation on plasma beta-endorphin levels in normal males. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 1986 May 31;9(2):115–23.
83. Sanders GE, Reinert O, Tepe R, Maloney P. Chiropractic adjustive manipulation on subjects with acute low back pain: visual analog pain scores and plasma beta-endorphin levels. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 1990 Aug 31;13(7):391–5.
84. Christian GFG, Stanton GJG, Sissons DD, How HYH, Jamison JJ, Alder BB, et al. Immunoreactive ACTH, beta-endorphin, and cortisol levels in plasma following spinal manipulative therapy. *Spine*. 1988 Nov 30;13(12):1411–7.

85. Teodorczyk-Injeyan JA, Injeyan HS, Ruegg R. Spinal Manipulative Therapy Reduces Inflammatory Cytokines but Not Substance P Production in Normal Subjects. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2006 Jan;29(1):14–21.
86. Richard A Roy DC M, FACSM JPBP, PhD ASC. Inflammatory response following a short-term course of chiropractic treatment in subjects with and without chronic low back pain. *Journal of Chiropractic Medicine*. National University of Health Sciences; 2010 Sep 1;9(3):107–14.
87. Nicoletti M, Neri G, Maccauro G, Tripodi D, Varvara G, Saggini A, et al. Impact of neuropeptide substance P an inflammatory compound on arachidonic acid compound generation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012 Sep 30;25(4):849–57.
88. Chin MS, Lancerotto L, Helm DL, Dastouri P, Prsa MJ, Ottensmeyer M, et al. Analysis of Neuropeptides in Stretched Skin. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2009 Jul;124(1):102–13.
89. Larson AA, Giovengo SL, Russell IJ, Michalek JE. Changes in the concentrations of amino acids in the cerebrospinal fluid that correlate with pain in patients with fibromyalgia: implications for nitric oxide pathways. *Pain*. 2000 Aug;87(2):201–11.
90. Frederickson RCR, Burgis VV, Harrell CEC, Edwards JDJ. Dual actions of substance P on nociception: possible role of endogenous opioids. *Science*. 1978 Mar 23;199(4335):1359–62.
91. STEWART JM, GETTO CJ, NELDNER K, REEVE EB, KRIVOY WA, ZIMMERMANN E. Substance P and analgesia. *Nature*. 1976 Aug 26;262(5571):784–5.
92. Nakatsuka T, Chen M, Takeda D, King C, Ling J, Xing H, et al. Substance P-driven feed-forward inhibitory activity in the mammalian spinal cord. *Mol Pain* [Internet]. 2004 Dec 31;1:20–0. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=15987503&retmode=ref&cmd=prlinks>
93. Wu L-JL, Xu HH, Ko SWS, Yoshimura MM, Zhuo MM. Feed-forward inhibition: a novel cellular mechanism for the analgesic effect of substance P. *Mol Pain* [Internet]. 2004 Dec 31;1:34–4. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16297242&retmode=ref&cmd=prlinks>
94. FIELD T, DIEGO M, Cullen C, HERNANDEZ-REIF M, Sunshine W, Douglas S. Fibromyalgia pain and substance P decrease and sleep improves after massage therapy. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*. 2002 Mar 31;8(2):72–6.
95. Brennan PC, Kokjohn K, Kaltinger CJ, Lohr GE, Glendening C, Hondras MA, et al. Enhanced phagocytic cell respiratory burst induced by spinal manipulation: potential role of substance P. *Journal of Manipulative and*

- Physiological Therapeutics. 1991 Aug 31;14(7):399–408.
96. Rossi GC, Matulonis JE, Richelson E, Barbut D, Pasternak GW. Systemically and Topically Active Antinociceptive Neurotensin Compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010 Aug 19;334(3):1075–9.
 97. Williams FG, Mullet MA, Beitz AJ. Basal release of Met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Research*. 1995 Sep 3;690(2):207–16.
 98. St-Gelais FF, Jomphe CC, Trudeau L-EL. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci*. 2006 Jun 30;31(4):229–45.
 99. Liu W, Bai B, Wang H, Song C, Lin B. [The effect of intrathecal injection of neurotensin on acupuncture analgesia in rats]. *Zhen Ci Yan Jiu*. 1994 Dec 31;20(3):13–7.
 100. Yang H-P, Wang L, Han L, Wang SC. Nonsocial Functions of Hypothalamic Oxytocin. *ISRN Neuroscience*. 2013;2013(4429):1–13.
 101. Yang J, Liang J-Y, Zhang X-Y, Qiu P-Y, Pan Y-J, Li P, et al. Oxytocin, but not arginine vasopressin is involving in the antinociceptive role of hypothalamic supraoptic nucleus. *Peptides*. 2011 May;32(5):1042–6.
 102. Breton J, Poisbeau P, Darbon P. Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. *Mol Pain*. 2009;5(1):63.
 103. Morhenn V, Beavin LE, Zak PJ. Massage increases oxytocin and reduces adrenocorticotropin hormone in humans. *Alternative therapies in health and medicine*. 2011;18(6):11–8.
 104. Uvnäs-Moberg K, Bruzelius G, Alster P, Bileviciute I, Lundeberg T. Oxytocin increases and a specific oxytocin antagonist decreases pain threshold in male rats. *Acta Physiol Scand*. 1992 Mar 31;144(4):487–8.
 105. Petersson MM, Wiberg UU, Lundeberg TT, Uvnäs-Moberg KK. Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation in rats. *Peptides*. 2001 Aug 31;22(9):1479–84.
 106. Takuwa H, Matsuura T, Bakalova R, Obata T, Kanno I. Contribution of nitric oxide to cerebral blood flow regulation under hypoxia in rats. *J Physiol Sci*. 2010 Oct 7;60(6):399–406.
 107. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Feb;7(2):156–67.
 108. Cauwels A, Bultinck J, Brouckaert P. Dual role of endogenous nitric oxide in tumor necrosis factor shock: induced NO tempers oxidative stress. *CMLS, Cell*

- Mol Life Sci. 2005 Jun 30;62(14):1632–40.
109. Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*. 2002 Apr;66(6):355–474.
 110. Luo ZD, Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception. *Current Review of Pain*. 2000 Dec;4(6):459–66.
 111. Aley KO, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *Journal of Neuroscience*. 1998 Aug 31;18(17):7008–14.
 112. Zhang JS. Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells. *AJP: Cell Physiology*. 2004 Mar 24;287(2):C292–9.
 113. Baskurt OK, Ulker P, Meiselman HJ. Nitric oxide, erythrocytes and exercise. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2010 Dec 31;49(1-4):175–81.
 114. Tsuchiya M, Sato EF, Inoue M, Asada A. Acupuncture enhances generation of nitric oxide and increases local circulation. *Anesthesia & Analgesia*. 2007 Jan 31;104(2):301–7.
 115. Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Feb;34(2):163–71.
 116. Bassett JRJ, Marshall PMP, Spillane RR. The physiological measurement of acute stress (public speaking) in bank employees. *Int J Psychophysiol*. 1987 Nov 30;5(4):265–73.
 117. Kodadek T, Cai D. Chemistry and biology of orexin signaling. *Mol BioSyst*. 2010;6(8):1366.
 118. Yan J-A, Ge L, Huang W, Song B, Chen X-W, Yu Z-P. Orexin affects dorsal root ganglion neurons: a mechanism for regulating the spinal nociceptive processing. *Physiol Res*. 2008;57(5):797–800.
 119. van den Pol ANA. Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *Journal of Neuroscience*. 1999 Apr 14;19(8):3171–82.
 120. Guan J-L, Wang Q-P, Shioda S. Immunoelectron microscopic examination of orexin-like immunoreactive fibers in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Research*. Elsevier; 2003;987(1):86–92.
 121. Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Nakazato M. Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neuroscience Letters*. 1999 Dec 31;288(2):87–90.
 122. Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience*. 2001 Dec 31;103(3):777–97.
 123. Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, et al. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain*. 2001 Apr

- 30;92(1-2):81–90.
124. Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *British Journal of Pharmacology*. 2002 Sep;137(2):170–6.
 125. Jeong Y, Holden JE. The role of spinal orexin-1 receptors in posterior hypothalamic modulation of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2009 Apr;159(4):1414–21.
 126. Feng X-M, Mi W-L, Xia F, Mao-Ying Q-L, Jiang J-W, Xiao S, et al. Involvement of spinal orexin A in the electroacupuncture analgesia in a rat model of post-laparotomy pain. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12(1):225.
 127. Michaleff ZA, Lin CWC, Maher CG, van Tulder MW. Spinal manipulation epidemiology: Systematic review of cost effectiveness studies. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. Elsevier Ltd; 2012 Oct 1;22(5):655–62.
 128. Metha DK, Ryan RSM, Hogerzeil HV. *Formulario modelo de la OMS 2004*. *Ars Medica*; 2004. 1 p.
 129. Nykoliation J, Mierau D. Adverse effects potentially associated with the use of mechanical adjusting devices: a report of three cases. *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*. The Canadian Chiropractic Association; 1999;43(3):161.
 130. Roberts JB. Fracture dislocation of the atlas without symptoms of spinal cord injury. *Annals of Surgery*. LWW; 1907;45(4):632–40.
 131. Assendelft WJ, Bouter LM, Knipschild PG. Complications of spinal manipulation: a comprehensive review of the literature. *J Fam Pract*. 1996 Apr 30;42(5):475–80.
 132. Sédat a J, Dib a M, Mahagne b MH, Lonjon b M, Paquis b P. Stroke after chiropractic manipulation as a result of extracranial postero-inferior cerebellar artery dissection. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2002 Nov;25(9):588–90.
 133. Ernst E. Deaths after chiropractic: a review of published cases. *International Journal of Clinical Practice*. 2010 Jun 16;64(8):1162–5.
 134. Carnes D, Mullinger B, Underwood M. Defining adverse events in manual therapies: a modified Delphi consensus study. *Manual Therapy*. 2010 Jan 31;15(1):2–6.
 135. Carnes D, Mars TS, Mullinger B, Froud R, Underwood M. Adverse events and manual therapy: A systematic review. *Manual Therapy*. Elsevier Ltd; 2010 Aug 1;15(4):355–63.
 136. Rubinstein SM, Leboeuf-Yde C, Knol DL, de Koekkoek TE, Pfeifle CE, van Tulder MW. The Benefits Outweigh the Risks for Patients Undergoing

- Chiropractic Care for Neck Pain: A Prospective, Multicenter, Cohort Study. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2007 Jul;30(6):408–18.
137. Senstad O, Leboeuf-Yde C, Borchgrevink C. Frequency and characteristics of side effects of spinal manipulative therapy. *Spine*. 1997 Feb 14;22(4):435–431.
138. Senstad O, Leboeuf-Yde C, Borchgrevink C. Predictors of side effects to spinal manipulative therapy. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 1996 Aug 31;19(7):441–5.
139. Walker BF, Hebert JJ, Stomski NJ, Clarke BR, Bowden RS, Losco B, et al. Outcomes of Usual Chiropractic; Harm (OUCH). A randomised controlled trial. *Spine*. 2013 Jun;:1.
140. Oliphant D. Safety of Spinal Manipulation in the Treatment of Lumbar Disk Herniations: A Systematic Review and Risk Assessment. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2004 Mar;27(3):197–210.
141. Fries JF. Assessing and understanding patient risk. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1992;92:21–4.
142. Hurwitz EL. Epidemiology: Spinal manipulation utilization. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2012 Oct;22(5):648–54.
143. Michaeli A. Reported occurrence and nature of complications following manipulative physiotherapy in South Africa. *Australian Journal of Physiotherapy*. 1993;39(4):309–15.
144. Eriksen K, Rochester RP, Hurwitz EL. Symptomatic reactions, clinical outcomes and patient satisfaction associated with upper cervical chiropractic care: A prospective, multicenter, cohort study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2011;12(1):219.
145. Miley ML, Wellik KE, Wingerchuk DM, Demaerschalk BM. Does Cervical Manipulative Therapy Cause Vertebral Artery Dissection and Stroke? *The Neurologist*. 2008 Jan;14(1):66–73.
146. Albuquerque FC, Hu YC, Dashti SR, Abla AA, Clark JC, Alkire B, et al. Craniocervical arterial dissections as sequelae of chiropractic manipulation: patterns of injury and management. *Journal of Neurosurgery*. 2011 Dec;115(6):1197–205.
147. Reggars JW, French SD, Walker BF, Cameron M, Pollard H, Vitiello A, et al. RISK MANAGEMENT FOR CHIROPRACTORS AND OSTEOPATHS: Neck Manipulation & Vertebrobasilar Stroke. *Australas Chiropr Osteopathy*. 2003 Feb 28;11(1):9–15.
148. Haynes MJ, Vincent K, Fischhoff C, Bremner AP, Lanlo O, Hankey GJ. Assessing the risk of stroke from neck manipulation: a systematic review. *International Journal of Clinical Practice*. 2012 Sep 19;66(10):940–7.

149. Jeffrey J Hebert DC P, PhD NJS, Simon D French PhD MPH BC, Sidney M Rubinstein DC P. ANIPULATIVE. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. National University of Health Sciences; 2013 Jun 14;:1–15.
150. Murphy DR. Current understanding of the relationship between cervical manipulation and stroke: what does it mean for the chiropractic profession? *Chiropr Osteopat*. 2010;18(1):22.
151. Haldeman S, Carey P, Townsend M, Papadopoulos C. Arterial dissections following cervical manipulation: the chiropractic experience. *CMAJ*. 2001 Oct 1;165(7):905–6.
152. Patijn J. Complications in manual medicine: a review of the literature. *J Manual Med*. 1991;6:89–92.
153. Haynes MJ. Doppler studies comparing the effects of cervical rotation and lateral flexion on vertebral artery blood flow. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 1996 Jun 30;19(6):378–84.
154. Symons BP, Leonard T, Herzog W. Internal forces sustained by the vertebral artery during spinal manipulative therapy. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2002 Oct;25(8):504–10.
155. Herzog W, Tang C, Leonard T. Internal Carotid Artery Strains During High-Speed, Low-Amplitude Spinal Manipulations of the Neck. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2012 Nov.
156. Symons B, Herzog W. Cervical artery dissection: a biomechanical perspective. *J Can Chiropr Assoc*. 2013 Nov 30;57(4):276–8.
157. Silbert PL, Mokri B, Schievink WI. Headache and neck pain in spontaneous internal carotid and vertebral artery dissections. *Neurology*. 1995 Jul 31;45(8):1517–22.
158. Sredni S, Sredni RAF. Headache caused by vertebral artery dissection: case report. *Revista Dor. SciELO Brasil*; 2012;13(4):382–4.
159. Schievink WI. Spontaneous dissection of the carotid and vertebral arteries. *N Engl J Med*. 2001 Mar 22;344(12):898–906.
160. Haynes MJ, Cala LA, Melsom A, Mastaglia FL, Milne N, McGeachie JK. Vertebral arteries and cervical rotation: modeling and magnetic resonance angiography studies. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2002 Jun 30;25(6):370–83.
161. Ernst E. Vascular accidents after neck manipulation: cause or coincidence? *International Journal of Clinical Practice*. 2010 May;64(6):673–7.
162. Cassidy JD, Boyle E, Côté P, He Y, Hogg-Johnson S, Silver FL, et al. Risk of vertebrobasilar stroke and chiropractic care: results of a population-based case-control and case-crossover study. *Spine*. 2008 Feb 15;33(4 Suppl):S176–83.

163. Gozke E, Tastekin Toz H, Kahraman Koytak P, Alparslan F. Postcoital Internal Carotid Artery Dissection Presenting as Isolated Painful Horner Syndrome: A Case Report. *Case Reports in Neurological Medicine*. 2013;2013(7):1–3.
164. Giroud M, Fayolle H, André N, Dumas R, Becker F, Martin D, et al. Incidence of internal carotid artery dissection in the community of Dijon. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Oct 31;57(11):1443–3.
165. Schievink WI, Bjornsson J, Piepgras DG. Coexistence of fibromuscular dysplasia and cystic medial necrosis in a patient with Marfan's syndrome and bilateral carotid artery dissections. *Stroke*. 1994 Dec 1;25(12):2492–6.
166. Schievink WI, Michels VV, Piepgras DG. Neurovascular manifestations of heritable connective tissue disorders. A review. *Stroke*. 1994 Apr 1;25(4):889–903.
167. Schievink WI, Mokri B, Piepgras DG, Kuiper JD. Recurrent spontaneous arterial dissections risk in familial versus nonfamilial disease. *Stroke*. *Am Heart Assoc*; 1996;27(4):622–4.
168. Dabbs VV, Lauretti WJW. A risk assessment of cervical manipulation vs. NSAIDs for the treatment of neck pain. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 1995 Sep 30;18(8):530–6.
169. Epstein N, Forte Esq C. Medicolegal corner: Quadriplegia following chiropractic manipulation. *Surg Neurol Int*. 2013;4(6):327.
170. Tabloie B. Quadraparesis following Chiropractic Manipulation: A Case Report. *J Clin Case Rep*. 2012;02(08).
171. Hartel MJ, Seidel U, Iselin L, Exadaktylos AK, Benneker LM. Partial tetraplegic syndrome as a complication of a mobilizing/manipulating procedure of the cervical spine in a man with Forestier's disease: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. *BioMed Central Ltd*; 2011 Oct 27;5(1):529.
172. Tseng S-H, Lin S-M, Chen Y, Wang C-H. Ruptured cervical disc after spinal manipulation therapy: report of two cases. *Spine*. *LWW*; 2002;27(3):E80–2.
173. Oppenheim JS, Spitzer DE, Segal DH. Nonvascular complications following spinal manipulation. *The Spine Journal*. 2005 Nov;5(6):660–6.
174. Lee KP, Carlini WG, McCormick GF, Albers GW. Neurologic complications following chiropractic manipulation: a survey of California neurologists. *Neurology*. 1995 May 31;45(6):1213–5.
175. Rivett DA, Milburn P. Complications Arising from Spinal Manipulative Therapy in New Zealand. *Physiotherapy*. 1997 Dec;83(12):626–32.
176. Murphy DR, Beres JL. Cervical Myelopathy: A Case Report of a “Near-Miss” Complication to Cervical Manipulation. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2008 Sep;31(7):553–7.

177. Schmitz A, Lutterbey G, Engelhardt von L, Falkenhausen von M, Stoffel M. Pathological cervical fracture after spinal manipulation in a pregnant patient. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 2005 Oct;28(8):633–6.
178. Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas N. Parálisis unilateral del diafragma secundaria a manipulación quiropráctica cervical. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2003 Oct 10;16:1–4.
179. Schram DJ, Vosik W, Cantral D. Diaphragmatic paralysis following cervical chiropractic manipulation: case report and review. *Chest*. 2001 Feb;119(2):638–40.
180. Morelli N, Gallerini S, Gori S, Chiti A, Cosottini M, Orlandi G, et al. Intracranial hypotension syndrome following chiropractic manipulation of the cervical spine. *J Headache Pain*. 2006 Aug 11;7(4):211–3.
181. Segal DH, Lidov MW, Camins MB. Cervical epidural hematoma after chiropractic manipulation in a healthy young woman: case report. *Neurosurgery*. 1996 Oct 31;39(5):1043–5.
182. Lu D, Kusnezov N, Velani S. Cerebrospinal fluid leak secondary to chiropractic manipulation. *Surg Neurol Int*. 2013;4(3):118.
183. Ernst E. Ophthalmological adverse effects of (chiropractic) upper spinal manipulation: evidence from recent case reports. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2005 Jul 29;83(5):581–5.
184. Struewer J, Frangen TM, Ziring E, Hinterseher U, Kirazidis I. Massive hemothorax after thoracic spinal manipulation for acute thoracolumbar pain. *Orthop Rev (Pavia)*. 2013 Jul 24;5(3).
185. Masneri DA, Helphenstine JS, Masneri SM, Miller MA, Levsky ME. Trauma-induced pneumothorax after “bear-hug back crack” home remedy: attempted spinal manipulation by a layperson. *J Am Osteopath Assoc*. 2007 Aug 31;107(9):411–3.
186. Klougart N, Leboeuf-Yde C, Rasmussen LR. Safety in chiropractic practice. Part II: Treatment to the upper neck and the rate of cerebrovascular incidents. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 1996 Oct 31;19(9):563–9.
187. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med*. 2010 Jun;48(6):757–67.
188. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *British Medical Bulletin*. 2007 Feb 6;81-82(1):209–30.
189. Schneider CM, Dennehy CA, Rodearmel SJ, Hayward JR. Effects of physical activity on creatine phosphokinase and the isoenzyme creatine kinase-MB. *Ann Emerg Med*. 1995 Mar 31;25(4):520–4.

190. Van Nieuwenhoven FA, Kleine AH, Wodzig WH, Hermens WT, Kragten HA, Maessen JG, et al. Discrimination between myocardial and skeletal muscle injury by assessment of the plasma ratio of myoglobin over fatty acid-binding protein. *Circulation*. 1995 Nov 14;92(10):2848–54.
191. Kaundal M, Sharma S. Analysis of isoproterenol-induced changes in gastrocnemius muscle and serum lactate dehydrogenase expression in mice. *Singapore medical journal*. 2011;52(4):274–82.
192. Baird MF, Graham SM, Baker JS, Bickerstaff GF. Creatine-Kinase- and Exercise-Related Muscle Damage Implications for Muscle Performance and Recovery. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012;2012(4):1–13.
193. Sorichter S, Mair J, Koller A, Gebert W, Rama D, Calzolari C, et al. Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society; 1997;83(4):1076–82.
194. Sorichter S, Mair J, Koller A, Calzolari C, Huonker M, Pau B, et al. Release of muscle proteins after downhill running in male and female subjects. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. Wiley Online Library; 2001;11(1):28–32.
195. Elkind. Levels of acute phase proteins remain stable after ischemic stroke. *BMC Neurol*. 2005 Dec 31;6:37–7.
196. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003 Jun 15;111(12):1805–12.
197. Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke*. 1987 Sep 1;18(5):911–8.
198. Papa L. Exploring the role of biomarkers for the diagnosis and management of traumatic brain injury patients. *Proteomics–Human Diseases and Protein Functions*. 2012;;89–106.
199. Royds JA, Timperley WR, Taylor CB. Levels of enolase and other enzymes in the cerebrospinal fluid as indices of pathological change. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1981 Nov 30;44(12):1129–35.
200. Sygusch J, Beaudry D, Allaire M. Molecular architecture of rabbit skeletal muscle aldolase at 2.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Acad Sciences; 1987;84(22):7846–50.
201. Singh RP, Sastry KVH, Agarwal R, Pandey NK, Saxena VK, Mohan J. Molecular and kinetic characterization of lactate dehydrogenase enzyme in the heart and breast muscle of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. The Scientific and Technological Research Council of Turkey; 2012;36(6):628–34.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se reconoce que los cuadros de dolor y disfunción de origen musculoesquelético tanto lumbares, como dorsales o cervicales, generan un elevado coste social y sanitario. Ésto es debido en una parte a la demora en la reincorporación a la vida laboral, y en otra a una percepción empobrecida de su calidad de vida (problemas para conciliar el sueño e irascibilidad entre otros aspectos).

El abordaje de esta patología es amplio, siendo competencia de varios profesionales sanitarios como los médicos o los fisioterapeutas. Dentro de la fisioterapia, una de las técnicas más utilizadas en el manejo de estas condiciones es la MV. A pesar de ser una técnica utilizada desde antes de la era científica, de ser ampliamente utilizada por diversos terapeutas, y de haber mostrado ser eficaz en el alivio del dolor y la mejora la función, hoy en día los mecanismos por los cuales es eficaz aun no están claramente descritos. Se valoran varias hipótesis de mecanismo de acción sobre el dolor como son; los efectos inhibitorios segmentarios, o los efectos inhibitorios descendentes.

Numerosos autores a su vez advierten del peligro de usar la MV por los posibles efectos adversos que puedan estar asociados a su utilización. Mientras que la MVC sostiene prácticamente el grueso de la literatura sobre los efectos adversos asociados a una MV, la MVT apenas a referido casos a pesar de ser la región torácica donde más MV se realizan. Una de las hipótesis que explican la posible causa de estos efectos adversos es la asociación entre lesiones de los tejidos y las MV. Parece necesario corroborar dicha afirmación o bien refutarla para poder tener un conocimiento más exhaustivo de las indicaciones de la MV.

OBJETIVOS

Objetivo General:

El objetivo general de esta tesis Doctoral es determinar si tras una MVT o una MVC se producen cambios inmediatos en la concentración plasmática de químicos que puedan justificar alguno de los mecanismos de la MV (Artículos I Y II), y si la intervención produce lesiones histológicas (Artículo III).

Objetivos Específicos:

- Analizar la concentración plasmática de NT, OT, SP, ON, orexina A y cortisol previa a la MVC y posterior a ella (Artículos I y II).
- Determinar si la MVC tiene como efecto, un cambio significativo en las concentraciones plasmática de NT, OT, SP, ON, orexina A y cortisol (Artículos I y II).
- Analizar la concentración plasmática de NT, OT, SP, ON, orexina A y cortisol previa a la MVT y posterior a ella (Artículos I y II).
- Determinar si la MVT tiene como efecto, un cambio significativo en las concentraciones plasmática de NT, OT, SP, ON, orexina A y cortisol (Artículos I y II).
- Analizar la percepción del dolor en localizaciones proximales y distales, valoradas a través de la obtención de los UDP en dichas localizaciones (Artículo II).
- Determinar si la MVC tiene como efecto un cambio significativo sobre los UDP locales y a distancia(Artículo II).
- Determinar si la MVT tiene como efecto un cambio significativo sobre los UDP locales y a distancia(Artículo II).
- Analizar las concentraciones plasmáticas de LDH, CPK, PCR, ENS, troponina, mioglobina y aldolasa, previa a la MVC y posterior a ella (Artículo III).
- Determinar si la MVC tiene como efecto, un cambio significativo en las concentraciones plasmática de LDH, CPK, PCR, ENS, troponina, mioglobina y aldolasa (Artículo III).

- Analizar las concentraciones plasmáticas de LDH, CPK, PCR, ENS, troponina, mioglobina y aldolasa, previa a la MVT y posterior a ella (Artículo III).
- Determinar si la MVT tiene como efecto, un cambio significativo en las concentraciones plasmática de LDH, CPK, PCR, ENS, troponina, mioglobina y aldolasa (Artículo III).

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los estudios que componen la presente tesis fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Jaén.

El diseño de la presente tesis se describe a continuación. Los análisis bioquímicos realizados en cada uno de los estudios, así como la metodología estadística se encuentran descritos en los artículos tal cual han sido publicados.

Sujetos:

A todos los sujetos se les explicó por escrito y verbalmente en qué consistía el experimento y firmaron un consentimiento informado, accediendo a participar en él de manera libre y voluntaria.

Treinta sujetos cumplieron los criterios de inclusión y fueron aleatorizados en tres grupos con un n=10.

Intervenciones:

Manipulación cervical: se realizó una movilización de alta velocidad y corta amplitud de recorrido sobre la columna cervical segmentos (C4-C5). El paciente estaba en decúbito supino y para llegar a final de rango fisiológico se usó la combinación de una rotación izquierda de unos 30° e inclinación contralateral. El impulso consistió en un movimiento de rotación puro de corto recorrido y gran velocidad.

Manipulación torácica: se realizó una movilización de alta velocidad y corta amplitud de recorrido sobre la columna torácica segmentos (T3-T4). El paciente estaba en decúbito supino con los brazos cruzados sobre el pecho. El impulso consistió en un movimiento anteroposterior de corto recorrido y gran velocidad.

Extracción sanguínea: a todos los sujetos se les realizó una extracción de sangre antes, después y a las dos horas de la intervención. Las muestras sanguíneas fueron extraídas por venopuntura de la vena cefálica usando un sistema Vacutainer (Becton-Dickinson, United Kindom).

Estudio I: Changes in Biochemical Markers of Pain Perception and Stress Response After Spinal Manipulation.

Determinación de la concentración plasmática de NT, OT, orexina a y Cortisol a través del sistema Luminex®. La determinación de la concentración plasmática fue llevada a cabo en la Universidad de Granada.

Estudio II: Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception.

Determinación de la concentración plasmática de SP a través del sistema Luminex® y de ON por el procedimiento de Braman y Hendrix. La determinación de la concentración plasmática de sustancia P fue llevada a cabo en la Universidad de Granada. La determinación de ON se realizó en la Universidad de Jaén.

Determinación de los UDP a través de un algómetro de presión en tres localizaciones: sobre la proyección de la articulación cigapofisaria (C5-C6), sobre el epicóndilo lateral y sobre el músculo tibial anterior. En cada localización se realizaron tres medidas y se estableció la media de las tres medidas como el valor real.

Estudio III: Tissue damage markers after a spinal manipulation in healthy subjects: A preliminary report of a randomized controlled trial.

Determinación de la concentración en suero de CPK, LDH, y aldolasa a través de un procedimiento enzimático en el analizador OLYMPUS AU5400 (Beckman-Coulter, USA). Determinación de la concentración en suero de Troponina-I y ENS a través de quimioluminiscencia (Dimension EXL, Siemens, Germany). Determinación de la concentración en suero de CRP a través de un procedimiento de turbidimetría (OYMPUS AU5400 Analyzer, Beckman-Coulter, USA). Determinación de la concentración en suero de mioglobina a través de un inmunoanálisis enzimático (Dimension EXL, Siemens, Germany). Todos las determinaciones fueron realizadas en el Hospital Médico-Quirúrgico del Complejo Hospitalario de Jaén.

En las tablas 1, 2 y 3 se muestra el Material y los Métodos utilizados en los diferentes artículos que componen la presente tesis.

Tabla 1. Tabla resumen del material y métodos utilizados en el artículo I.

ARTÍCULO	I. Changes in Biochemical Markers of Pain Perception and Stress Response After Spinal Manipulation.
DISEÑO	ECA
SUJETOS	30 sujetos superan los criterios de elección y firman el consentimiento informado. -MVC (n=10). -MVT (n=10). -Control (n=10).
INTERVENCIÓN	-MVC : Los sujetos en decúbito supino reciben una técnica de alta velocidad y corto recorrido orientada a la columna cervical media (C4) y baja (C5). -MCT: Los sujetos en decúbito supino reciben una técnica de alta velocidad y corto recorrido orientada a la columna dorsal media-alta (T3-5). -Control: Los sujetos permanecieron en decúbito supino.
VARIABLES	Concentración plasmática de NT, OT, orexina A y cortisol, expresado en pg/mg de la proteína total.
MÉTODO	-Extracción sanguínea por venopuntura de la vena cefálica. -Determinación de la concentración plasmática de NT, OT, orexina A y cortisol a través del sistema Luminex®.

Tabla 2. Tabla resumen del material y métodos utilizados en el artículo II.

ARTÍCULO	II. Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception.
DISEÑO	ECA
SUJETOS	<p>30 sujetos superan los criterios de elección y firman el consentimiento informado.</p> <p>-MVC (n=10).</p> <p>-MVT (n=10).</p> <p>-Control (n=10).</p>
INTERVENCIÓN	<p>-MVC : Los sujetos en decúbito supino reciben una técnica de alta velocidad y corto recorrido orientada a la columna cervical media (C4) y baja (C5).</p> <p>-MCT: Los sujetos en decúbito supino reciben una técnica de alta velocidad y corto recorrido orientada a la columna dorsal media-alta (T3-5).</p> <p>-Control: Los sujetos permanecieron en decúbito supino.</p>
VARIABLES	<p>-Concentración plasmática de SP expresado en pg/mg de la proteína total.</p> <p>-Concentración plasmática de ON expresado en $\mu\text{mol/mg}$ de la proteína total.</p> <p>-UDP expresado en kg/cm^2.</p> <p>-Extracción sanguínea por venopuntura de la vena cefálica.</p> <p>-Determinación de la concentración plasmática de SP a través del sistema LumineX[®], y de ON por el procedimiento de Braman y Hendrix.</p>
MÉTODO	<p>-La determinación de los UDP se realizó a través de un algómetro de presión en tres localizaciones: sobre la proyección de la articulación cigapofisaria (C5-C6), sobre el epicóndilo lateral y sobre el músculo tibial anterior. En cada localización se realizaron 3 medidas y se estableció la media de las tres medidas como el valor real.</p>

Tabla 3. Tabla resumen del material y métodos utilizados en el artículo III.

ARTÍCULO	III. Tissue damage markers after a spinal manipulation in healthy subjects: A preliminary report of a randomized controlled trial.
DISEÑO	ECA
SUJETOS	30 sujetos superan los criterios de elección y firman el consentimiento informado. -MVC (n=10). -MVT (n=10). -Control (n=10).
INTERVENCIÓN	-MVC : Los sujetos en decúbito supino reciben una técnica de alta velocidad y corto recorrido orientada a la columna cervical media (C4) y baja (C5). -MCT: Los sujetos en decúbito supino reciben una técnica de alta velocidad y corto recorrido orientada a la columna dorsal media-alta (T3-5). -Control: Los sujetos permanecieron en decúbito supino.
VARIABLES	-Concentración plasmática de CPK, LDH, PCR, aldolasa, troponina, ENS y mioglobina. LDH U/L; CPK U/L; PCR mg/L; ENS ng/mL; Aldolasa U/L; Troponina I ng/mL; Mioglobina ng/mL.
MÉTODO	-Extracción sanguínea por venopuntura de la vena cefálica. -Determinación de la concentración en suero de CPK, LDH, PCR y aldolasa a través del sistema OLYMPUS AU5400 Analyzer. La de troponina I y la ENS a través de quimioluminiscencia. Y la de mioglobina a través de un inmunanálisis enzimático.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y la discusión de la presente tesis se exponen en los artículos tal cual han sido publicados.

I

ARTÍCULO I

CHANGES IN BIOCHEMICAL MARKERS OF PAIN PERCEPTION AND STRESS RESPONSE AFTER SPINAL MANIPULATION

Plaza-Manzano G, Molina-Ortega F, Lomas-Vega R, Martínez-Amat A, Achalandabaso
A, Hita-Contreras F

J Orthop Sports Phys Ther

2014 Apr;44(4):231–9

[RESEARCH REPORT]

GUSTAVO PLAZA-MANZANO, PT¹ • FRANCISCO MOLINA, PT, PhD² • RAFAEL LOMAS-VEGA, PT, PhD²
 ANTONIO MARTÍNEZ-AMAT, PhD² • ALEXANDER ACHALANDABASO, PT¹ • FIDEL HITTA-CONTRERAS, MD, PhD²

Changes in Biochemical Markers of Pain Perception and Stress Response After Spinal Manipulation

Spinal manipulation (SM) is a common treatment approach for pain reduction in low back and neck disorders.^{37,38,41} The effectiveness of SM to treat musculoskeletal pain, such as spinal pain, has been summarized in recent Cochrane reviews.^{32,56}

Overall, the evidence suggests that SM provides improvements in pain relief, though similar results have been described in other competing treatments, such as general practitioner management, medication, and exercise, in patients with musculoskeletal pain.^{6,7} It has been shown that the presence of pain in-

duces changes in the anatomy and function of the central and peripheral nervous systems.^{20,46,53} Therefore, research on an asymptomatic population may be important to accurately determine the antinociceptive mechanism of SM. Several studies in asymptomatic subjects have shown that SM techniques induce changes in

physiological reflexes,²⁸ increase neuromuscular excitability,²² and modify sensitivity.³⁰

The mechanisms through which SM alters musculoskeletal pain are still unknown. However, current evidence suggests an interaction between the mechanical stimulus and the associated neurophysiological responses,^{6,51} including rapid hypoalgesia with concurrent sympathetic nervous system and motor system excitation, similar to those generated by direct stimulation of the periaqueductal gray matter.^{61,68} Recent animal studies show that the analgesia produced by joint mobilization involves serotonin and noradrenaline receptors in the spinal cord, thereby performing a supporting role for central mechanisms of pain modulation.⁶⁰ Several neuropeptides, such as neurotensin,²³ oxytocin,²⁹ or orexin A,³ have been associated with hypoalgesia and pain modulation, and it is well known that cortisol plays an analgesic role related to stress responses.^{4,44} Recent theories have also suggested that chronic pain could be partly maintained by maladaptive physiological responses of the organism facing a recurrent stressor, a situation related to high cortisol levels.^{45,66} To our knowledge, there is a lack of studies analyzing changes in these nociception-related biochemical markers in response to manual therapy.

● **STUDY DESIGN:** Controlled, repeated-measures, single-blind randomized study.

● **OBJECTIVES:** To determine the effect of cervical or thoracic manipulation on neurotensin, oxytocin, orexin A, and cortisol levels.

● **BACKGROUND:** Previous studies have researched the effect of spinal manipulation on pain modulation and/or range of movement. However, there is little knowledge of the biochemical process that supports the antinociceptive effect of spinal manipulation.

● **METHODS:** Thirty asymptomatic subjects were randomly divided into 3 groups: cervical manipulation (n = 10), thoracic manipulation (n = 10), and nonmanipulation (control) (n = 10). Blood samples were extracted before, immediately after, and 2 hours after each intervention. Neurotensin, oxytocin, and orexin A were determined in plasma using enzyme-linked immuno assay. Cortisol was measured by microparticulate enzyme immuno assay in serum samples.

● **RESULTS:** Immediately after the intervention, significantly higher values of neurotensin ($P < .05$) and oxytocin ($P < .001$) levels were observed with both cervical and thoracic manipulation, whereas cortisol concentration was increased only in the cervical manipulation group ($P < .05$). No changes were detected for orexin A levels. Two hours after the intervention, no significant differences were observed in between-group analysis.

● **CONCLUSION:** The mechanical stimulus provided by spinal manipulation triggers an increase in neurotensin, oxytocin, and cortisol blood levels. Data suggest that the initial capability of the tissues to tolerate mechanical deformation affects the capacity of these tissues to produce an induction of neuropeptide expression. *J Orthop Sports Phys Ther* 2014;44(4):231-239. Epub 22 January 2014. doi:10.2519/jospt.2014.4996

● **KEY WORDS:** cortisol, neurotensin, orexin A, oxytocin, spinal manipulation

¹Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. ²Department of Health Sciences, Universidad de Jaén, Jaén, Spain. The protocol for this study was approved by the Ethical Committee in Clinical Research of the Universidad de Jaén, Jaén, Spain. The authors certify that they have no affiliations with or financial involvement in any organization or entity with a direct financial interest in the subject matter or materials discussed in the article. Address correspondence to Dr Fidel Hita-Contreras, Department of Health Sciences (B-3/272), Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain. E-mail: fhita@ujaen.es ● Copyright ©2014 Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®

[RESEARCH REPORT]

There are controversial opinions regarding the antinociceptive effects of SM according to the site of application. Some authors have reported that cervical manipulation may produce better analgesic effects than thoracic manipulation,⁵² and other authors have not detected differences in pain relief between the 2 techniques.⁴³ To make better therapeutic decisions, professionals would profit from knowing whether one type of SM is better than others in terms of antinociceptive effects. Taking these data into account, our purpose was to determine whether cervical and thoracic manipulation would induce differences in neuropeptide production or have a similar biochemical response. The aim of this study was to evaluate the effects of cervical and thoracic SM on the plasmatic concentration of biochemical markers (neurotensin, orexin A, oxytocin, and cortisol). This study represents a preliminary step in advancing the understanding of the underlying mechanisms of SM treatment and its effects.

METHODS

Subjects

THE SAMPLE POPULATION CONSISTED of graduate students who responded to advertisements placed in the University of Jaén (Spain). All subjects signed an informed consent form approved by the University of Jaén Institutional Review Board prior to participating in the study. Participants were verbally screened for their history of neck pain and for current use of any drug. Those who had 1 or more of the following conditions were excluded from the study: contraindication to manipulation, history of whiplash or cervical surgery, pain related to cervical spine or arm in the previous month, headache in the previous days, spinal manipulative therapy in the previous 2 months, or loss of standing balance. The study was approved by the Ethical Committee in Clinical Research of the University of Jaén, and the protocol was performed following the Ethical



FIGURE 1. Thoracic spinal manipulation.

Principles for Medical Research in Humans of the Declaration of Helsinki.

Interventions

SM procedures consisted of standard techniques performed as described by Gibbons and Tehan.³¹ The thoracic SM technique involved a high-velocity, end-range, anterior-posterior force through the elbows to the middle thoracic spine (T3-4) on the lower thoracic (T4-5) spine in a supine position, with the patient's arms crossed (FIGURE 1). The cervical manipulation involved a high-velocity, midrange, left rotational force to the mid cervical spine (C4) on the lower cervical spine (C5) in supine, with left rotation and right sidebending (FIGURE 2).

Blood samples and active cervical rotation movement were obtained from all subjects before, immediately after, and 2 hours after the intervention. Confounding factors such as time of day (circadian rhythms), prior diet, and activity patterns were controlled in the 2-hour period prior to reassessment. All interventions were performed at the same time of day for each participant.

Outcome Measures

Extracting Blood Samples and Obtaining Serum/Plasma Serum samples were extracted by venipuncture of the cephalic vein, according to a standardized protocol³⁶ that used a Vacutainer system (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Blood was collected in a tube for serum (Vacutainer SST II Advance,



FIGURE 2. Cervical spinal manipulation.

model 367953) and a tube for plasma (Vacutainer PST II Advance, model 367374) separation. After blood extraction, tubes stood at room temperature for 1 hour until the blood clotted. Afterward, the tubes were centrifuged for 10 minutes at 2000g (Avanti J-30I; Beckman Coulter, Inc, Brea, CA). Supernatant was collected, aliquoted, and kept at -80°C until used.

Neuropeptide Quantification It has been shown that neurotensin is implicated in analgesia via its actions within central and peripheral pain modulatory circuits,²³ oxytocin plays an antinociceptive role in the central nervous system,² and orexin is involved in nociceptive sensory processes.^{3,24} Neuropeptides were determined by a Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX) assay (Milliplex; EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). This kit allows the simultaneous quantification of neurotensin, orexin A, and oxytocin (Milliplex HNP-35K; EMD Millipore Corporation). Plasma samples were thawed at room temperature and processed following recommendations from the manufacturer. Neuropeptide data were normalized with the total protein concentration of each sample, which was calculated using the Bradford assay.¹⁰ Cortisol has been found to correlate inversely with pain intensity, and in this sense, a specific increase of cortisol has been proven to have an antinociceptive effect.¹ Cortisol concentration was determined in serum samples using the microparticulate enzyme immuno assay in the AxSYM analyzer (Abbott Labo-

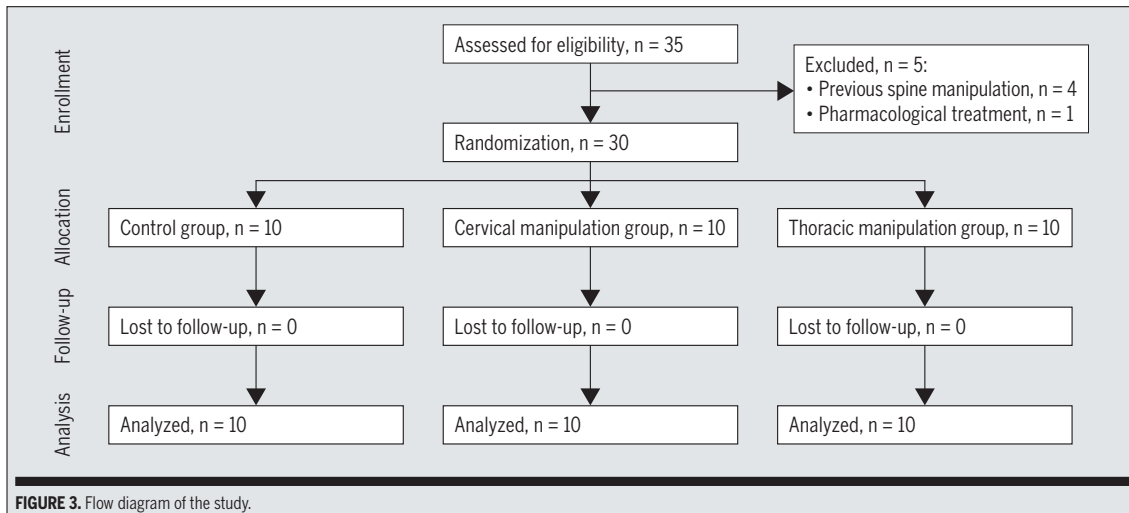


FIGURE 3. Flow diagram of the study.

TABLE 1		BASELINE CHARACTERISTICS OF PARTICIPANTS*			
	All (n = 30)	Control (n = 10)	Thoracic Manipulation (n = 10)	Cervical Manipulation (n = 10)	
Age, y	27.80 ± 4.16	25.80 ± 3.22	29.80 ± 4.52	27.80 ± 3.99	
Weight, kg	69.50 ± 12.94	70.80 ± 4.94	69.00 ± 14.95	68.70 ± 17.00	
Height, m	1.73 ± 0.09	1.75 ± 0.07	1.73 ± 0.11	1.73 ± 0.08	
BMI, kg/m ²	22.98 ± 3.19	23.20 ± 1.41	22.93 ± 3.60	22.82 ± 4.23	
Gender, n (%)					
Male	16 (53.3)	6 (60.0)	5 (50.0)	5 (50.0)	
Female	14 (46.7)	4 (40.0)	5 (50.0)	5 (50.0)	
Student, n (%)					
No	17 (56.7)	4 (40.0)	8 (80.0)	5 (50.0)	
Yes	13 (43.3)	6 (60.0)	2 (20.0)	5 (50.0)	
Married, n (%)					
No	22 (73.3)	7 (70.0)	7 (70.0)	8 (80.0)	
Yes	8 (26.7)	3 (30.0)	3 (30.0)	2 (20.0)	
Smoker, n (%)					
No	17 (56.7)	8 (80.0)	4 (40.0)	5 (50.0)	
Yes	13 (43.3)	2 (20.0)	6 (60.0)	5 (50.0)	

Abbreviation: BMI, body mass index.
*Values are mean ± SD unless otherwise indicated.

ratories, Abbott Park, IL) following the manufacturer’s recommendations.

Statistical Analysis

Data for continuous variables were expressed as mean ± SD. Categorical data were expressed as frequencies and per-

centages. The Kolmogorov-Smirnov and Levene tests were performed to assess normality and homoscedasticity, respectively. A 3-by-3, mixed-model analysis of variance (ANOVA) was performed to test the effect of the factor (control, thoracic manipulation, and cervical manipula-

tion) on the dependent variables (range of motion and concentration of neurotensin, orexin A, oxytocin, and cortisol). The hypothesis of interest was the group-by-time interaction. Additionally, to find out if there was any significant interaction, a Bonferroni pairwise comparison was performed. Pearson correlation coefficients were used to analyze the relations between continuous variables. Eta-square and adjusted R² were used for measuring effect sizes. Management and data analysis were performed using the statistical package SPSS for Windows Version 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) and MedCalc Version 12.5 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). The level of statistical significance was set at P<.05.

RESULTS

OUT OF THE 35 PARTICIPANTS screened, 30 subjects (46.7% women; mean ± SD age, 27.8 ± 4.2 years) satisfied the eligibility criteria, agreed to participate, and were randomized by sealed-envelope selection into the cervical SM group (n = 10), the thoracic SM group (n = 10), or a control group that did not receive any treatment (n = 10) (FIGURE 3). Baseline characteristics of participants are shown in TABLE 1.

Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®
Downloaded from www.jospt.org at on April 4, 2014. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2014. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®. All rights reserved.

[RESEARCH REPORT]

TABLE 2	INTERGROUP COMPARISON OF NEUROPEPTIDE LEVELS*				
	Preintervention	0 h Postintervention	2 h Postintervention	P Value [†]	Effect Size, η^2
Neurotensin [‡]					
Control	4.95 ± 1.24	5.47 ± 1.22	4.93 ± 1.30	.029	0.179
Thoracic	5.15 ± 1.85	9.34 ± 2.33	6.16 ± 2.64		
Cervical	6.58 ± 1.67	10.33 ± 3.95	8.01 ± 3.84		
Orexin A [†]				.210	0.101
Control	209.06 ± 23.85	205.13 ± 21.97	200.95 ± 26.76	<.001	0.622
Thoracic	207.51 ± 66.93	160.89 ± 46.19	153.78 ± 43.63		
Cervical	211.72 ± 48.50	193.17 ± 66.96	167.03 ± 59.93		
Oxytocin [†]				<.001	0.622
Control	52.41 ± 15.73	50.77 ± 21.65	46.06 ± 13.64	<.001	0.326
Thoracic	53.12 ± 15.53	147.19 ± 51.11	58.39 ± 26.16		
Cervical	58.45 ± 20.69	251.35 ± 91.36	85.68 ± 52.87		
Cortisol [§]				<.001	0.326
Control	9.90 ± 3.48	9.60 ± 3.10	9.70 ± 3.13	<.001	0.326
Thoracic	9.80 ± 3.08	10.10 ± 3.67	6.70 ± 2.50		
Cervical	10.51 ± 3.37	14.20 ± 3.58	8.50 ± 3.89		

*Values are mean ± SD unless otherwise indicated.
[†]Time by group.
[‡]Concentration of neuropeptides in plasma samples (pg/mg of total protein).
[§]Concentration of cortisol in serum samples (pg/mg of total protein).

Neurotensin Concentration in Blood Samples

The 3-by-3, mixed-model ANOVA revealed a significant interaction of time by group for neurotensin concentration ($P = .029$), with an eta-square value of 18% (TABLE 2). On the other hand, within-group comparisons in cervical and thoracic manipulation groups showed a significant increase in neurotensin levels immediately postintervention compared with preintervention levels ($P < .05$) (TABLE 3). For the between-group analysis (FIGURE 4A), statistically significant differences were found on posttreatment measurements between the control group and the thoracic manipulation group (mean difference, -3.87; 95% confidence interval [CI]: -6.00, -0.74; $P = .012$) and between the control and the cervical manipulation groups (mean difference, -4.86; 95% CI: -7.99, -1.74; $P = .001$).

Orexin A Concentration in Blood Samples

A 3-by-3, mixed-model ANOVA did not show a significant interaction of group by time for orexin A concentration in blood samples ($P = .210$) (TABLE 2). The effect size, measured by eta-square, was 10%. At the descriptive level, an important decrease in orexin A concentration was detected after the intervention in the thoracic SM group in comparison with the control group (mean difference, 47.16; 95% CI: -4.78, 99.10; $P = .085$), although this decrease did not reach statistical significance (FIGURE 4B).

Oxytocin Concentration in Blood Samples

The group-by-time interaction was significant for oxytocin plasma concentration ($P < .001$). The effect size, measured by eta-square, was 62% (TABLE 2). An increase in oxytocin concentration was detected just after the intervention in both the cervical SM group (mean difference, -200.58; 95% CI: -271.03, -130.12; $P < .001$) and the thoracic SM group (mean difference, -96.42; 95% CI: -166.87, -25.96; $P = .005$) when compared with the control group. In

TABLE 3	WITHIN-GROUP COMPARISON OF PRETREATMENT VALUES AND VALUES IMMEDIATELY AFTER INTERVENTION	
	Mean Difference*	P Value
Neurotensin [†]		
Control	-0.522 (-2.790, 1.745)	1.000
Thoracic	-4.188 (-6.456, -1.921)	<.001
Cervical	-3.752 (-6.019, -1.485)	.001
Orexin A [†]		
Control	3.936 (-42.821, 50.692)	1.000
Thoracic	46.621 (-0.136, 93.377)	.051
Cervical	18.552 (-28.205, 65.308)	.961
Oxytocin [†]		
Control	1.642 (-43.042, 46.326)	1.000
Thoracic	-94.063 (-138.747, -49.379)	<.001
Cervical	-192.899 (-237.583, -148.215)	<.001
Cortisol [†]		
Control	0.300 (-1.659, 2.259)	1.000
Thoracic	-0.300 (-2.259, 1.659)	1.000
Cervical	-3.690 (-5.649, -1.731)	<.001

*Pretreatment minus immediately posttreatment values. Values in parentheses are 95% confidence interval.
[†]Mean difference of neuropeptide concentration in plasma samples (pg/mg of total protein).
[‡]Mean difference of cortisol in serum samples (pg/mg of total protein).

Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®
 Downloaded from www.jospt.org at on April 4, 2014. For personal use only. No other uses without permission.
 Copyright © 2014. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®. All rights reserved.

the same way, the cervical SM group showed increased oxytocin values when compared with the thoracic SM group immediately postintervention (mean difference, -104.16; 95% CI: -174.62, -33.71; $P < .002$) (FIGURE 4C).

Likewise, in the within-group analysis, an increase in oxytocin plasma concentration levels was detected in both the cervical manipulation and thoracic manipulation groups immediately postintervention ($P < .001$) compared to preintervention levels (TABLE 3). At 2 hours after the intervention, an increase was found only in the cervical SM group ($P < .05$) when compared with preintervention levels (TABLE 4).

Cortisol Concentration in Blood Samples

Using a mixed-model ANOVA, the group-by-time interaction for cortisol as a dependent variable was significant ($P < .001$). Eta-square analysis yielded a 32% effect size (TABLE 2).

Blood samples extracted from the cervical SM group showed a significant increase in cortisol plasma concentration immediately postintervention compared with baseline values ($P < .001$) (TABLE 3). On the other hand, a significant decrease was detected at 2 hours postintervention in the thoracic SM group when compared with the preintervention values ($P < .05$) (TABLE 4).

A significant increase in the between-group analysis was found immediately posttreatment in the cervical manipulation group compared with the control group (mean difference, 4.60; 95% CI: 0.65, 8.55; $P = .018$) and the thoracic manipulation group (mean difference, 4.10; 95% CI: 0.15, 8.05; $P < .040$) (FIGURE 4D).

DISCUSSION

SEVERAL STUDIES CURRENTLY SUPPORT the idea that the analgesic effect of manual therapy is mediated by central mechanisms of pain modulation through the modulation of neuropeptide production.^{5,27,60} To our knowledge, this is the first work to analyze neurotensin,

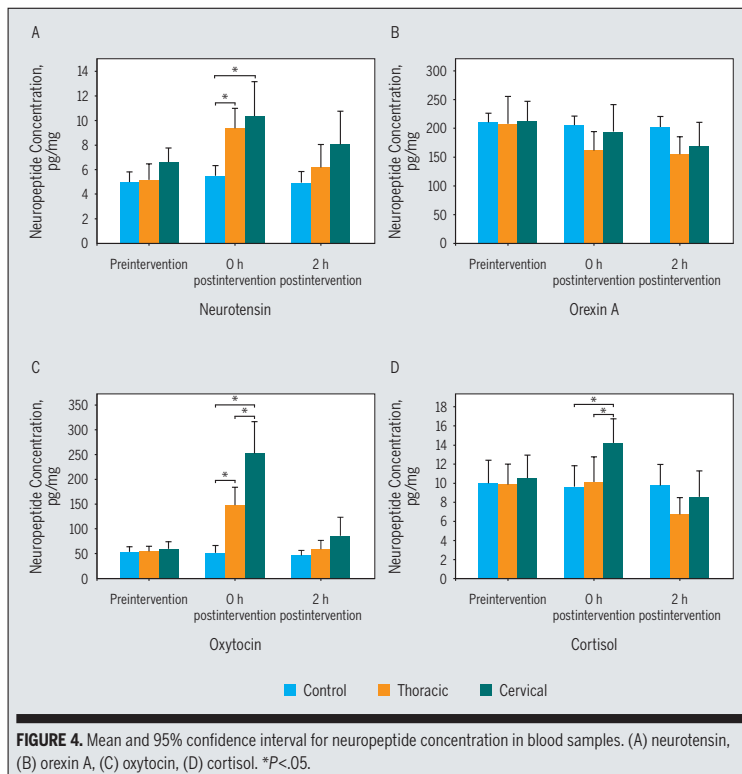


FIGURE 4. Mean and 95% confidence interval for neuropeptide concentration in blood samples. (A) neurotensin, (B) orexin A, (C) oxytocin, (D) cortisol. * $P < .05$.

oxytocin, orexin A, and cortisol levels after a cervical or a thoracic manipulation in asymptomatic subjects.

Neurotensin is a 13-amino acid produced in several regions of the central nervous system, such as the substantia nigra, amygdala, hypothalamus, prefrontal cortex, periaqueductal gray matter, and the spinal cord,⁶² and it has several actions, including analgesia.^{14,23} Our data indicate an increase in neurotensin plasmatic concentration after an SM, suggesting that the mechanical stimulus provided by SM is enough to modulate the liberation of this neuropeptide. In this sense, neurotensin has long been known to include analgesia among its actions.^{9,16,23} The analgesic actions of neurotensin are readily distinct from those of the opioids, based on their insensitivity to the highly opioid-selective antagonist naloxone, thus ruling out an opioid mechanism.⁵⁵ Neurotensin acts as

part of the peripheral and central mechanisms of pain modulation,²³ because the antinociceptive effect of neurotensin has been reported after the injection of the peptide in many brain areas.⁶² There are anatomical data suggesting an interaction between neurotensin and serotonergic neurons. As a matter of fact, neurons of the rostral part of the raphe synthesize neurotensin, whereas neurotensin receptors are widely expressed in most of the raphe.^{18,40,57} The functional role of neurotensin in the raphe remains to be determined, but it may participate in the modulation of some of the known functions of the serotonergic system, including nociception¹³ and stress-related responses.¹⁹ It may also play a role in mediating stress-induced analgesia, as neurotensin knockout mice and rats pretreated with neurotensin antagonists show no increase in pain tolerance after stress.³⁴ Recent studies with neurotensin

Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®
Downloaded from www.jospt.org at on April 4, 2014. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2014 Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®. All rights reserved.

[RESEARCH REPORT]

antagonists and knockout mice lacking neurotensin or neurotensin receptors have revealed that the neurotensinergic system plays a pivotal role in the nonopioid form of stress-induced analgesia.^{34,42,58} In summary, the antinociceptive effect of neurotensin after SM may increase the mechanical stress threshold that cervical tissues can tolerate.

It is well established that neurotensin affects the activity of oxytocin-positive cells in the supraoptic nucleus.³⁹ Oxytocin is a nonapeptide that plays a major neuroendocrine role, modulating several physiological functions in mammals, like somatosensory transmission, nociception, and pain.^{2,64,65} Oxytocin is synthesized and secreted by a subpopulation of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus.⁶⁴ In fact, several studies now support the idea that oxytocin exerts a potent antinociceptive control after its release in the spinal cord from hypothalamo-hypophysal descending projections.^{17,59,73} Breton et al¹² have shown that this antinociceptive action is mediated, in part, by an increase in synaptic inhibition within the most superficial layers of the spinal cord. In addition, Robinson et al⁵⁴ showed that oxytocin inhibits sensory glutamatergic transmission between afferent fibers and dorsal horn neurons. Along the same lines, Petersson et al⁵⁰ hypothesized that an increase of oxytocin might possibly result in a greater synthesis of endogenous opioids, because the antinociception observed after repeated injections of oxytocin was temporarily reversed by the opioid antagonist naloxone.

In studies involving human subjects, pain relief was reported in central neurogenic pain and in low back pain⁷² after the intracerebroventricular and intrathecal administration of oxytocin. No previous study has evaluated whether SM has an effect on oxytocin plasmatic concentration. Our results suggest that the increase of the plasmatic concentration of oxytocin following an SM could be partly responsible for the analgesic effect linked to manual therapy techniques due to the activation

TABLE 4		
WITHIN-GROUP COMPARISON BETWEEN PRETREATMENT VALUES AND VALUES 2 HOURS AFTER INTERVENTION		
	Mean Difference*	P Value
Neurotensin [†]		
Control	0.018 (-2.260, 2.296)	1.000
Thoracic	-1.014 (-3.292, 1.264)	.798
Cervical	-1.431 (-3.709, 0.847)	.362
Orexin A [‡]		
Control	8.117 (-38.213, 54.447)	1.000
Thoracic	53.729 (7.399, 100.060)	.019
Cervical	44.683 (-1.647, 91.014)	.062
Oxytocin [†]		
Control	6.357 (-16.001, 28.714)	1.000
Thoracic	-5.270 (-27.627, 17.087)	1.000
Cervical	-27.236 (-49.594, -4.879)	.013
Cortisol [†]		
Control	0.200 (-2.156, 2.556)	1.000
Thoracic	3.100 (0.744, 5.456)	.007
Cervical	2.010 (-0.346, 4.366)	.115

*Values in parentheses are 95% confidence interval.
[†]Mean difference of neuropeptide concentration in plasma samples (pg/mg of total protein).
[‡]Mean difference of cortisol in serum samples (pg/mg of total protein).

of descending pain-inhibitory pathways.

Orexins are known to be a hypothalamic peptide critical for feeding and normal wakefulness. Orexin A and B are distributed throughout the spinal cord, and orexin fibers are concentrated in lamina I of the dorsal horn and in lamina X surrounding the central canal.⁷¹ Orexinergic projections were identified in periaqueductal gray matter, the rostral ventral medulla, the dorsal horn, and the dorsal root ganglion.^{21,33,67} Emerging evidence shows that the central nervous system administration (intracranial ventricle or intrathecal injection) of orexin A can suppress mechanical allodynia and thermal hypersensitivity in multiple pain models, suggesting the regulation of nociceptive processing via spinal and supraspinal mechanisms.^{8,70}

In addition, orexins showed antinociceptive effects on models of pain, such as neuropathic pain, carrageenan test, and postoperative pain.^{47,48} There is a lack of literature that analyzes the effect of physical therapy techniques on orexin

A expression. A recent study using a rat model reported a significant increase of orexin A following electroacupuncture therapy after a laparotomy.²⁵ In contrast, our results did not show a statistically significant change in orexin A levels after a thoracic or cervical SM.

One of the actions of orexin A in stress situations is the activation of glucocorticoid production from adrenocortical cells.¹¹ Cortisol is therefore one of the biochemical factors delivered in stress situations³⁵ that acts to decrease local edema and pain by blocking early stages of inflammation. In addition, it is also believed that high cortisol levels promote wound healing by stimulating gluconeogenesis.⁶⁹ The response to stress is triggered by the stimulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. It has been proven that a subject's level of stress can be correlated with secreted cortisol levels.⁴ Our results suggest that no plasmatic concentration changes of cortisol follow a thoracic SM, which agrees with the results of a recent review using mas-

Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®
 Downloaded from www.jospt.org at on April 4, 2014. For personal use only. No other uses without permission.
 Copyright © 2014. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®. All rights reserved.

sage therapy.⁴⁹ Those authors⁴⁹ reported that no change in salivary cortisol followed massage therapy in symptomatic and asymptomatic subjects. A study by Whelan et al⁶⁹ examined the effect of SM on salivary cortisol levels and found no effect in asymptomatic subjects. Nevertheless, we found a significant increase of cortisol plasmatic concentration following cervical manipulation, which does not agree with previous results.^{15,69} A possible explanation for this could be the use of venipuncture to obtain blood samples. Venipuncture is thought to be a stress factor that may increase circulating cortisol levels.²⁶ The use of blood testing for cortisol analysis should be questioned due to the possible increase in cortisol levels due to the invasive nature of the vein puncture required for blood sampling, and to the anticipatory stress experienced by the knowledge of the subject of the impending needle.⁶³ Even so, all 3 groups were exposed to the vein puncture, and changes were only observed in response to cervical SM. In our opinion, the use of a control group provides a certain degree of confidence that the results of cortisol plasmatic concentration are related to the technique.

CONCLUSION

TAKEN TOGETHER, THE RESULTS OF this study show that cervical and thoracic manipulation resulted in an increase in neurotensin, oxytocin, and plasmatic cortisol concentration in asymptomatic individuals. These neuropeptides are related to the modulation of nociception and stress-induced analgesia. These findings suggest that descending inhibitory pathway mechanisms may be involved in the physiological effects that follow SM. In addition, the effect size for the cervical manipulation group was larger than that for the thoracic manipulation group. This suggests an increase in the activation of the possible descending inhibitory pathway mechanisms after cervical manipulation compared to thoracic manipulation. Further studies with

larger sample sizes of both asymptomatic and symptomatic neck-pain populations are required to determine the effect of SM on antinociceptive neuropeptide levels more accurately. ●

KEY POINTS

FINDINGS: Mechanical stimuli derived from SM can modify neuropeptide expression in asymptomatic subjects.

IMPLICATIONS: The findings of this study suggest that some of the beneficial effects of SM may relate to neurochemical changes.

CAUTION: The small sample size of the population of asymptomatic subjects is the main limitation of this study. The biochemical response after SM in symptomatic subjects may not be extrapolated from the results of the present study.

REFERENCES

- al'Absi M, Nakajima M, Grabowski J. Stress response dysregulation and stress-induced analgesia in nicotine dependent men and women. *Biol Psychol*. 2013;93:1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsycho.2012.12.007>
- Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Influence of oxytocin on nociception and morphine antinociception. *Neuropeptides*. 1993;24:125-129.
- Azhdari Zarmehri H, Semnani S, Fathollahi Y, et al. Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-A decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats. *J Pain*. 2011;12:280-287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2010.09.006>
- Bassett JR, Marshall PM, Spillane R. The physiological measurement of acute stress (public speaking) in bank employees. *Int J Psychophysiol*. 1987;5:265-273.
- Bello D, White-Traut R, Schwartz D, Pournajafi-Nazarloo H, Carter CS. An exploratory study of neurohormonal responses of healthy men to massage. *J Altern Complement Med*. 2008;14:387-394. <http://dx.doi.org/10.1089/acm.2007.0660>
- Bialosky JE, Bishop MD, Price DD, Robinson ME, George SZ. The mechanisms of manual therapy in the treatment of musculoskeletal pain: a comprehensive model. *Man Ther*. 2009;14:531-538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2008.09.001>
- Bialosky JE, Bishop MD, Robinson ME, Barabas JA, George SZ. The influence of expectation on spinal manipulation induced hypoalgesia: an experimental study in normal subjects. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008;9:19. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2474-9-19>
- Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, et al. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain*. 2001;92:81-90.
- Boules M, Fredrickson P, Richelson E. Bioactive analogs of neurotensin: focus on CNS effects. *Peptides*. 2006;27:2523-2533. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2005.12.018>
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brennan PC, Kokjohn K, Kaltinger CJ, et al. Enhanced phagocytic cell respiratory burst induced by spinal manipulation: potential role of substance P. *J Manipulative Physiol Ther*. 1991;14:399-408.
- Breton JD, Poisbeau P, Darbon P. Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. *Mol Pain*. 2009;5:63. <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-5-63>
- Buhler AV, Choi J, Proudfit HK, Gebhart GF. Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain*. 2005;114:285-294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2004.12.031>
- Cheng JK, Chou RC, Hwang LL, Chiou LC. Antialloodynic effects of intrathecal orexins in a rat model of postoperative pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307:1065-1071. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.103.056663>
- Christian GF, Stanton GJ, Sissons D, et al. Immunoreactive ACTH, beta-endorphin, and cortisol levels in plasma following spinal manipulative therapy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1988;13:1411-1417.
- Clineschmidt BV, McGuffin JC. Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur J Pharmacol*. 1977;46:395-396.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, López Hidalgo M, Freund-Mercier MJ. Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res*. 2006;1081:126-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.050>
- Cooper PE, Fernstrom MH, Rorstad OP, Leeman SE, Martin JB. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res*. 1981;218:219-232. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)91302-0](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(81)91302-0)
- Corley KC, Phan TH, Daugherty WP, Boadle-Biber MC. Stress-induced activation of median raphe serotonergic neurons in rats is potentiated by the neurotensin antagonist, SR 48692. *Neurosci Lett*. 2002;319:1-4.
- Crosby ND, Weisshaar CL, Winkelstein BA. Spinal neuronal plasticity is evident within 1 day after a painful cervical facet joint injury. *Neurosci Lett*. 2013;542:102-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.03.019>
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Nakazato M.

[RESEARCH REPORT]

Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neurosci Lett*. 2000;288:87-90.

22. Dishman JD, Ball KA, Burke J. First prize: central motor excitability changes after spinal manipulation: a transcranial magnetic stimulation study. *J Manipulative Physiol Ther*. 2002;25:1-9.
23. Dobner PR. Neurotensin and pain modulation. *Peptides*. 2006;27:2405-2414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.025>
24. Erami E, Azhdari-Zarmehri H, Ghasemi-Dashkhasan E, Esmaeili MH, Semnianian S. Intra-paragigantocellularis lateralis injection of orexin-A has an antinociceptive effect on hot plate and formalin tests in rat. *Brain Res*. 2012;1478:16-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.013>
25. Feng XM, Mi WL, Xia F, et al. Involvement of spinal orexin A in the electroacupuncture analgesia in a rat model of post-laparotomy pain. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:225. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-12-225>
26. Ferriani RA, Silva de Sá MF. Effect of venipuncture stress on plasma prolactin levels. *Int J Gynaecol Obstet*. 1985;23:459-462.
27. Field T, Hernandez-Reif M, Diego M, Schanberg S, Kuhn C. Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy. *Int J Neurosci*. 2005;115:1397-1413. <http://dx.doi.org/10.1080/00207450590956459>
28. Fryer G, Pearce AJ. The effect of lumbosacral manipulation on corticospinal and spinal reflex excitability on asymptomatic participants. *J Manipulative Physiol Ther*. 2012;35:86-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmpt.2011.09.010>
29. Gao L, Yu LC. Involvement of opioid receptors in the oxytocin-induced antinociception in the central nervous system of rats. *Regul Pept*. 2004;120:53-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2004.02.011>
30. George SZ, Bishop MD, Bialosky JE, Zepieri G, Jr., Robinson ME. Immediate effects of spinal manipulation on thermal pain sensitivity: an experimental study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2006;7:68. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2474-7-68>
31. Gibbons P, Tehan P. *Manipulation of the Spine, Thorax and Pelvis: An Osteopathic Perspective*. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone; 2000.
32. Gross A, Miller J, D'Silva J, et al. Manipulation or mobilisation for neck pain: a Cochrane Review. *Man Ther*. 2010;15:315-333. <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2010.04.002>
33. Guan JL, Wang QP, Shioda S. Immunoelectron microscopic examination of orexin-like immunoreactive fibers in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res*. 2003;987:86-92.
34. Gui X, Carraway RE, Dobner PR. Endogenous neurotensin facilitates visceral nociception and is required for stress-induced antinociception in mice and rats. *Neuroscience*. 2004;126:1023-1032. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.034>
35. Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:163-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.026>
36. Himberger JR, Himberger LC. Accuracy of drawing blood through infusing intravenous lines. *Heart Lung*. 2001;30:66-73. <http://dx.doi.org/10.1067/mhl.2001.110535>
37. Huisman PA, Speksnijder CM, de Wijer A. The effect of thoracic spine manipulation on pain and disability in patients with non-specific neck pain: a systematic review. *Disabil Rehabil*. 2013;35:1677-1685. <http://dx.doi.org/10.3109/09638288.2012.750689>
38. Hurwitz EL. Epidemiology: spinal manipulation utilization. *J Electromyogr Kinesiol*. 2012;22:648-654. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelekin.2012.01.006>
39. Johnstone LE, Leng G, Brown CH. Effects of neurotensin on the organization of activity in supra-optic nucleus cells in virgin and lactating rats. *J Neuroendocrinol*. 2004;16:605-611. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01208.x>
40. Kessler JP, Moysé E, Kitabgi P, Vincent JP, Beaudet A. Distribution of neurotensin binding sites in the caudal brainstem of the rat: a light microscopic radioautographic study. *Neuroscience*. 1987;23:189-198. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90282-X](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(87)90282-X)
41. Kuczynski JJ, Schwieterman B, Columer K, Knupp D, Shaub L, Cook CE. Effectiveness of physical therapist administered spinal manipulation for the treatment of low back pain: a systematic review of the literature. *Int J Sports Phys Ther*. 2012;7:647-662.
42. Lafrance M, Roussy G, Belleville K, et al. Involvement of NTS2 receptors in stress-induced analgesia. *Neuroscience*. 2010;166:639-652. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.042>
43. Martínez-Segura R, de-la-Llave-Rincón Al, Ortega-Santiago R, Cleland JA, Fernández-de-las-Peñas C. Immediate changes in widespread pressure pain sensitivity, neck pain, and cervical range of motion after cervical or thoracic thrust manipulation in patients with bilateral chronic mechanical neck pain: a randomized clinical trial. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2012;42:806-814. <http://dx.doi.org/10.2519/jospt.2012.4151>
44. Matousek RH, Dobkin PL, Pruessner J. Cortisol as a marker for improvement in mindfulness-based stress reduction. *Complement Ther Clin Pract*. 2010;16:13-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.06.004>
45. Melzack R. Pain and the neuromatrix in the brain. *J Dent Educ*. 2001;65:1378-1382.
46. Melzack R,Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL. Central neuroplasticity and pathological pain. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;933:157-174.
47. Mobarakeh JI, Takahashi K, Sakurada S, et al. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly administered orexin A in histamine H1 or H2 receptor gene knockout mice. *Pain*. 2005;118:254-262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2005.08.024>
48. Mobarakeh JI, Takahashi K, Sakurada S, et al. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly and intrathecally-administered orexin A and B (hypocretin-1 and -2) in mice. *Peptides*. 2005;26:767-777. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.001>
49. Moyer CA, Seefeldt L, Mann ES, Jackley LM. Does massage therapy reduce cortisol? A comprehensive quantitative review. *J Bodyw Mov Ther*. 2011;15:3-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbmt.2010.06.001>
50. Petersson M, Alster P, Lundberg T, Uvnäs-Moberg K. Oxytocin increases nociceptive thresholds in a long-term perspective in female and male rats. *Neurosci Lett*. 1996;212:87-90. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12773-7](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(96)12773-7)
51. Pickar JG. Neurophysiological effects of spinal manipulation. *Spine J*. 2002;2:357-371.
52. Puentedura EJ, Landers MR, Cleland JA, Mintken PE, Huijbregts P, Fernández-de-las-Peñas C. Thoracic spine thrust manipulation versus cervical spine thrust manipulation in patients with acute neck pain: a randomized clinical trial. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2011;41:208-220. <http://dx.doi.org/10.2519/jospt.2011.3640>
53. Quinn KP, Dong L, Golder FJ, Winkelstein BA. Neuronal hyperexcitability in the dorsal horn after painful facet joint injury. *Pain*. 2010;151:414-421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2010.07.034>
54. Robinson DA, Wei F, Wang GD, et al. Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *J Physiol*. 2002;540:593-606.
55. Rossi GC, Matulonis JE, Richelson E, Barbut D, Pasternak GW. Systemically and topically active antinociceptive neurotensin compounds. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334:1075-1079. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.109.165282>
56. Rubinstein SM, van Middelkoop M, Assendelft WJ, de Boer MR, van Tulder MW. Spinal manipulative therapy for chronic low-back pain: an update of a Cochrane review. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36:E825-E846. <http://dx.doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182197fe1>
57. Sarret P, Perron A, Stroh T, Beaudet A. Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 2003;461:520-538. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.10718>
58. Seta KA, Jansen HT, Kreitel KD, Lehman M, Behbehani MM. Cold water swim stress increases the expression of neurotensin mRNA in the lateral hypothalamus and medial preoptic regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;86:145-152.
59. Shiraishi T, Onoe M, Kojima T, Sameshima Y, Kageyama T. Effects of hypothalamic paraventricular nucleus: electrical stimulation produce marked analgesia in rats. *Neurobiology (Bp)*. 1995;3:393-403.
60. Skyba DA, Radhakrishnan R, Rohlwing JJ, Wright A, Sluka KA. Joint manipulation reduces hyperalgesia by activation of monoamine receptors but not opioid or GABA receptors in the spinal

cord. *Pain*. 2003;106:159-168.

61. Sterling M, Jull G, Wright A. Cervical mobilisation: concurrent effects on pain, sympathetic nervous system activity and motor activity. *Man Ther*. 2001;6:72-81. <http://dx.doi.org/10.1054/math.2000.0378>

62. St-Gelais F, Jomphe C, Trudeau LE. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci*. 2006;31:229-245.

63. Tuchin PJ. The effect of chiropractic spinal manipulative therapy on salivary cortisol levels. *Australas Chiropr Osteopathy*. 1998;7:86-92.

64. Uvnäs-Moberg K, Bruzelius G, Alster P, Bileviciute I, Lundeberg T. Oxytocin increases and a specific oxytocin antagonist decreases pain threshold in male rats. *Acta Physiol Scand*. 1992;144:487-488. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.1992.tb09327.x>

65. Uvnäs-Moberg K, Petersson M. [Oxytocin, a mediator of anti-stress, well-being, social interaction, growth and healing]. *Z Psychosom Med Psychother*. 2005;51:57-80.

66. Vachon-Presseau E, Roy M, Martel MO, et al. The stress model of chronic pain: evidence from basal cortisol and hippocampal structure and function in humans. *Brain*. 2013;136:815-827. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aws371>

67. van den Pol AN. Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci*. 1999;19:3171-3182.

68. Vicenzino B, Collins D, Benson H, Wright A. An investigation of the interrelationship between manipulative therapy-induced hypoalgesia and sympathoexcitation. *J Manipulative Physiol Ther*. 1998;21:448-453.

69. Whelan TL, Dishman JD, Burke J, Levine S, Sciotti V. The effect of chiropractic manipulation on salivary cortisol levels. *J Manipulative Physiol Ther*. 2002;25:149-153.

70. Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *Br J Pharmacol*. 2002;137:170-176. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704851>

71. Yan JA, Ge L, Huang W, Song B, Chen XW, Yu ZP. Orexin affects dorsal root ganglion neurons: a mechanism for regulating the spinal nociceptive processing. *Physiol Res*. 2008;57:797-800.

72. Yang J. Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19:867-871.

73. Yirmiya R, Ben-Eliyahu S, Shavit Y, Marek P, Liebeskind JC. Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Res*. 1990;537:169-174.

 **MORE INFORMATION**
WWW.JOSPT.ORG

Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®
Downloaded from www.jospt.org at on April 4, 2014. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2014. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy®. All rights reserved.

PUBLISH Your Manuscript in a Journal With International Reach

JOSPT offers authors of accepted papers an **international audience**. The *Journal* is currently distributed to the members of APTA's Orthopaedic and Sports Physical Therapy Sections and **31 orthopaedics, manual therapy, and sports groups in 25 countries** who provide online access either as a member benefit or at a discount. As a result, the *Journal* is now distributed monthly to more than **28 500 individuals around the world** who specialize in musculoskeletal and sports-related rehabilitation, health, and wellness. In addition, *JOSPT* reaches students and faculty, physical therapists and physicians at more than **1,250 institutions in 57 countries**. Please review our Information for and Instructions to Authors at www.jospt.org in the **Info Center** for **Authors** and submit your manuscript for peer review at <http://mc.manuscriptcentral.com/jospt>.

II

ARTÍCULO II

IMMEDIATE EFFECTS OF SPINAL MANIPULATION ON NITRIC OXIDE, SUBSTANCE P AND PAIN PERCEPTION

Molina-Ortega F, Lomas-Vega R, Hita-Contreras F, Plaza-Manzano G,
Achalandabaso A, Ramos-Morcillo AJ, Martínez-Amat A

Manual Therapy

2014 <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2014.02.007>

ARTICLE IN PRESS

Manual Therapy xxx (2014) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

Manual Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/math

Original article

Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception

Francisco Molina-Ortega^a, Rafael Lomas-Vega^a, Fidel Hita-Contreras^{a,*},
Gustavo Plaza Manzano^b, Alexander Achalandabaso^a, Antonio J. Ramos-Morcillo^a,
Antonio Martínez-Amat^a

^a Department of Health Sciences, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

^b Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Complutense University School of Medicine, Avda. de Séneca, 2. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2013
Received in revised form
15 February 2014
Accepted 23 February 2014

Keywords:

Spinal manipulation
Substance P
Nitric oxide
Pressure pain threshold

ABSTRACT

Previous studies have analyzed the effects of spinal manipulation on pain sensitivity by using several sensory modalities, but to our knowledge, no studies have focused on serum biomarkers involved in the nociceptive pathway after spinal manipulation. Our objectives were to determine the immediate effect of cervical and dorsal manipulation over the production of nitric oxide and substance P, and establishing their relationship with changes in pressure pain thresholds in asymptomatic subjects. In this single-blind randomized controlled trial, 30 asymptomatic subjects (16 men) were randomly distributed into 3 groups ($n = 10$ per group): control, cervical and dorsal manipulation groups. Blood samples were extracted to obtain serum. ELISA assay for substance P and chemiluminescence analysis for nitric oxide determination were performed. Pressure pain thresholds were measured with a pressure algometer at the C5–C6 joint, the lateral epicondyle and the tibialis anterior muscle. Outcome measures were obtained before intervention, just after intervention and 2 h after intervention. Our results indicated an increase in substance P plasma level in the cervical manipulation group (70.55%) when compared with other groups ($p < 0.05$). This group also showed an elevation in the pressure pain threshold at C5–C6 (26.75%) and lateral epicondyle level (21.63%) immediately after the intervention ($p < 0.05$). No changes in nitric oxide production were observed. In conclusion, mechanical stimulus provided by cervical manipulation increases substance P levels and pressure pain threshold but does not change nitric oxide concentrations. Part of the hypoalgesic effect of spinal manipulation may be due to the action of substance P.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Manipulation of the spine is a manual therapy technique performed to increase range of motion in a joint with decreased joint play, with the intention of relieving the pain of patients. Spinal manipulation (SM) involves a high velocity “impulse” or “thrust” of short amplitude which is applied to interapophyseal joints. The effectiveness of SM to treat musculoskeletal pain has been summarized in recent systematic reviews. Overall, evidence suggests that SM provides greater relief for pain and function than a placebo

or no treatment (Gross et al., 2010; van Middelkoop et al., 2011). Although SM is widely used in the management of pain, the physiological basis of its effectiveness remains unknown. It has been proposed that the mechanical stimuli generated by SM could activate the liberation of many biochemical mediators from neural tissue (Skyba et al., 2003).

The perception of pain is clearly a complex process due to the high number of biochemical mediators involved. Nitric oxide (N–O), considered as the major local vasodilator (Takuwa et al., 2010), is a small molecule with a dual role in cell survival (Cauwels et al., 2005) and nociception (Millan, 2002). Nitric oxide is a diffusible gas that rapidly reacts with oxygen to form nitric oxide derivatives such as nitrite and nitrate (Lundberg et al., 2008). Although evidence exists regarding the beneficial effects of the release of small amounts of N–O during the inhibition of nociceptive pathways

* Corresponding author. Department of Health Sciences (B-3/272), University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain. Tel.: +34 953 212921; fax: +34 953 211875.

E-mail address: fhita@ujaen.es (F. Hita-Contreras).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2014.02.007>

1356-689X/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Molina-Ortega F, et al., Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception, Manual Therapy (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2014.02.007>

(Luo and Cizkova, 2000), other research suggests that N–O could contribute to hyperalgesia (Aley et al., 1998). Physiological mechanical stimuli such as blood shear stress (Binti et al., 2011) or tissue stretch (Zhang et al., 2004) induce the liberation of N–O from endothelial tissue and blood cells (Baskurt et al., 2011). It has been proven that the mechanical stimulus provided by physical therapy techniques, such as massage (Morhenn et al., 2012) or acupuncture (Tsuchiya et al., 2007), modulates pain perception by modifying N–O production.

The vasodilation triggered by N–O is an intricate process in which several pro-algogenic peptides such as Substance P (SP) (Tagawa et al., 1997) and glutamate (Meng et al., 1995) are involved. Substance P is a neuropeptide which mediates multiple activities in various cell types, including cell proliferation and inflammatory processes (Nicoletti et al., 2012). Although SP has been found to be widespread in the central nervous system, it is most abundant in the dorsal spinal roots as well as in unmyelinated sensory nerve fibers (Salt et al., 1983). Substance P can modulate inhibitory transmission in lamina V of the spinal cord thoracic horn, thereby exerting an analgesic effect on nociceptive sensory processing (Nakatsuka et al., 2005; Wu et al., 2005). Other studies have suggested that SP may cause generalized spinal cord hyperexcitability, reducing the patient's pain threshold in several chronic pain syndromes such as fibromyalgia (Larson et al., 2000).

Pain sensitivity has been measured through the application of different sensory modalities (Stahl and Drewes, 2004; Arendt-Nielsen and Yarnitsky, 2009). One of these modalities is the pressure pain threshold (PPT), which is defined as the minimal amount of pressure where a sense of pressure first changes to pain (Fischer, 1990). Pressure pain threshold is a validated measurement technique with good intra-observer reliability (Vanderweeen et al., 1996), used in physical therapy to determine mechanical stress sensitivity of the peripheral tissues. Previous studies have used PPT to assess pain sensitivity after spinal manipulation in both symptomatic (Fernandez-Carnero et al., 2011; Maduro de Camargo et al., 2011) and asymptomatic (Fryer et al., 2004; Orakifar et al., 2012) individuals.

Studies dealing with the correlations between N–O, SP, and PPT are scarce, and their results are disparate. For some authors, neurons with higher mechanical activation thresholds were activated by N–O donors (Levy and Strassman, 2004), while a decrease in nociceptive threshold was observed in N–O donors (Thomsen et al., 1997). The analysis of the relation between SP and PPT is also controversial, and as Basi et al. (2012) did not find any significant correlation, other authors have described negative (Appelgren et al., 1998) and positive correlations (Mazzotta et al., 1997) between them.

As mentioned above, previous research has analyzed the effects of SM on pain sensitivity by using several sensory modalities, but to our knowledge, no studies have focused on serum biomarkers involved in the nociceptive pathway after SM. On these bases, the main goal of the present study was to examine the immediate effects of a cervical or thoracic manipulation on pressure pain threshold (PPT) and serum N–O and SP levels in asymptomatic subjects. The secondary objective of this study was to analyze the correlation between N–O, SP, and PPT after SM in asymptomatic subjects.

2. Material and methods

2.1. Participants and experimental design

This was a single-blind randomized (sealed envelope system) controlled trial, performed in May 2012, in which 40 healthy subjects from the University of Jaén voluntarily took part in the

experiment and signed the agreement. A previous orthopedic screening process was performed to verify the absence of musculoskeletal pain at the time of the study. On the other hand, it has been shown that the presence of pain induces changes in the anatomy and function of the central and peripheral nervous system (Quinn et al., 2010; Crosby et al., 2013). Therefore, research on an asymptomatic population may be important to accurately determine the anti-nociceptive mechanism of SM. Subjects with a history of whiplash or cervical surgery, contraindication to SM, pain related to cervical spine or arm in the previous month, headache in the previous days, having undergone spinal manipulative therapy in the previous two months, regular use of analgesic or anti-inflammatory drugs, or loss of standing balance were excluded from the study. Thirty subjects (16 men, age: 27.8 ± 4.16) met the inclusion criteria and were randomized into three groups (control group, cervical manipulation group, and thoracic manipulation group) with 10 subjects per group (Fig. 1) (Allison et al., 2002). The study was approved by the Ethics Committee of the University of Jaén (Spain) and the protocol was performed following the Ethical Principles for Medical Research in Humans of the Declaration of Helsinki (41st World Medical Assembly. Declaration of Helsinki, 1990).

2.2. Interventions

In the intervention group, cervical manipulation was applied unilaterally on the posterior joint at the C5 to C6 vertebral level, according to the protocol provided by Dunning and Rushton (2009). The subject was supine with the cervical spine in neutral position. The index finger of the therapist applied a contact over the posterolateral aspect of the zygapophyseal joint of C5. The therapist cradled the subject's head with the opposite hand. Gentle ipsilateral side flexion and contralateral rotation to the targeted side were introduced until slight tension was perceived in the tissues at the contact point. A high-velocity-low-amplitude thrust manipulation was directed upward and medially in the direction of the subject's contralateral eye. Control participants were treated following the cervical manipulation protocol with regard to hand contact, except there was no application of tissue tension and thrust by the treating clinician.

Thoracic manipulation was performed with the subject in supine position, arms crossed over the chest and hands wrapped around the shoulders. The thoracic spine was in a neutral position. The clenched hand of the therapist made contact over the spinous process of T4. Gentle anterior to posterior pressure was applied with the chest of the therapist over the subject's elbow. Finally, a

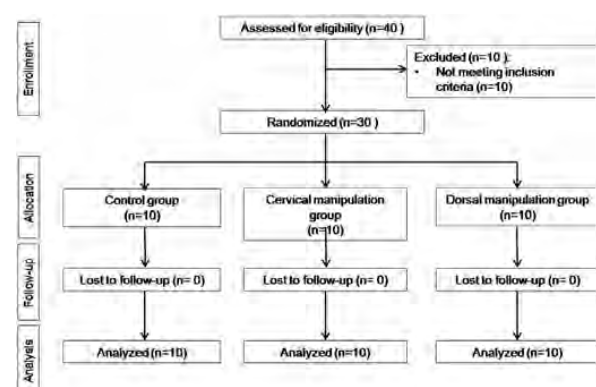


Fig. 1. Flow chart of participants.

ARTICLE IN PRESS

F. Molina-Ortega et al. / Manual Therapy xxx (2014) 1–7

3

high -velocity-low -amplitude thrust was applied following the same anterior to posterior direction.

All the evaluators were blinded to the intervention of the therapist.

2.3. Outcome measures

Pressure pain threshold measures and blood samples were obtained before intervention (pre-intervention), immediately just after intervention (0 h post-intervention) and 2 h after intervention (2 h post-intervention).

2.3.1. Blood sample preparation

Total blood samples were extracted by venipuncture of the cephalic vein using a Vacutainer system (Becton–Dickinson, United Kingdom). Blood was collected in tubes for serum separation (BD Vacutainer SST II Advance, ref. 367953). After blood extraction, tubes were let stand at room temperature for 1 h until the blood clotted. Afterward, tubes were centrifuged for 10 min at 2000 g (Avanti J-30I, Beckman Coulter, USA). Supernatant was collected, aliquoted and kept at -80 °C until used.

2.3.2. Nitric oxide determination

To carry out the analysis, the thawed serum aliquots were mixed in 1/2/2 (w/v/v) deproteinization buffer (0.5 N NaOH, 10% ZnSO4), briefly shaken and let stand at room temperature for 15 min. After that, samples were centrifuged for 5 min at 13,500 rpm and supernatants were collected and maintained at 4 °C until analyzed.

The total amount of nitric oxide and N–O derivatives was determined by a modification of the procedure described by Braman and Hendrix (1989) using NOA 280i the purge system of Sievers Instruments, model NOA 280i (GE Analytical Instruments, USA). Nitric oxide and N–O derivatives concentrations were calculated by comparison with standard solutions of sodium nitrate. Nitric oxide and N–O derivatives data were normalized with total protein concentration of each sample determined using the Bradford assay (Bradford, 1976).

2.3.3. Substance P determination

Plasma determination of SP was determined by using Luminex® technology with a specific ELISA kit (Milliplex Ref: HNP-35K, Millipore, USA). Substance P data were normalized with total protein

Table 1
Baseline characteristics of participants.

Characteristics	Control (n = 10)	Thoracic (n = 10)	Cervical (n = 10)	p-value
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Age	25.80 ± 3.22	29.80 ± 4.52	27.80 ± 3.99	0.095
Weight	63.60 ± 8.47	73.70 ± 14.33	71.20 ± 14.19	0.196
Height	1.71 ± 0.07	1.75 ± 0.06	1.75 ± 0.12	0.528
Substance P ^a	35.84 ± 9.36	36.23 ± 15.83	38.23 ± 18.34	0.930
Nitric oxide ^b	0.19 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.25 ± 0.17	0.021*
PPT C5–C6 ^c	3.76 ± 0.51	3.44 ± 1.54	3.29 ± 0.98	0.622
PPT Epi ^c	5.60 ± 3.44	4.63 ± 1.61	4.30 ± 1.65	0.462
PPT Tib ^c	8.54 ± 1.85	7.89 ± 2.23	7.85 ± 2.25	0.721
Protein content ^d	129.68 ± 35.84	128.79 ± 29.44	123.53 ± 27.07	0.892

*p < 0.05.

Abbreviations: PPT C5–C6 (pressure pain threshold at C5–C6 zygapophyseal joint); PPT Epi (pressure pain threshold at right lateral epicondyle); PPT Tib (pressure pain threshold at tibialis anterior muscle).

^a Substance P is expressed as pg/mg total protein.

^b Nitric oxide is expressed as μmol/mg total protein.

^c PPTs are expressed as kg/cm².

^d Protein content is expressed as μg/ml.

Table 2
Test-retest reliability for outcomes variables.

Variable	CCI	SEM	MDC
Substance P	0.679	5.303	10.39
Nitric oxide	0.620	0.012	0.02
PPT C5–C6	0.781	0.239	0.47
PPT Epi	0.736	1.768	3.46
PPT Tib	0.913	0.546	1.07

Abbreviations: CCI (Intraclass Correlation Coefficient); SEM (Standard Error of Measurement); MDC (Minimal Detectable Change); PPT C5–C6 (pressure pain threshold at C5–C6 zygapophyseal joint); PPT Epi (pressure pain threshold at right lateral epicondyle); PPT Tib (pressure pain threshold at tibialis anterior muscle).

concentration of each sample calculated by the Bradford method (Bradford, 1976).

2.3.4. Pressure pain threshold

A pressure algometer (Pain Test™ FPN 100, Wagner Instruments, USA) was used to measure PPT. In this study several PPT points were used to determine the local or regional (C5–C6 zygapophyseal joint, lateral epicondyle) and global effects (tibialis anterior) of the spinal manipulation to verify the presence of segmental and/or central modulation of pain (Urban and Gebhart, 1999; Schaible, 2007). All measurements were carried out by a well-trained expert.

2.4. Statistical analysis

Demographic and experimental data were treated with the SPSS® 19.0 (IBM, USA) and MedCalc 12.3 (MedCalc, Belgium)

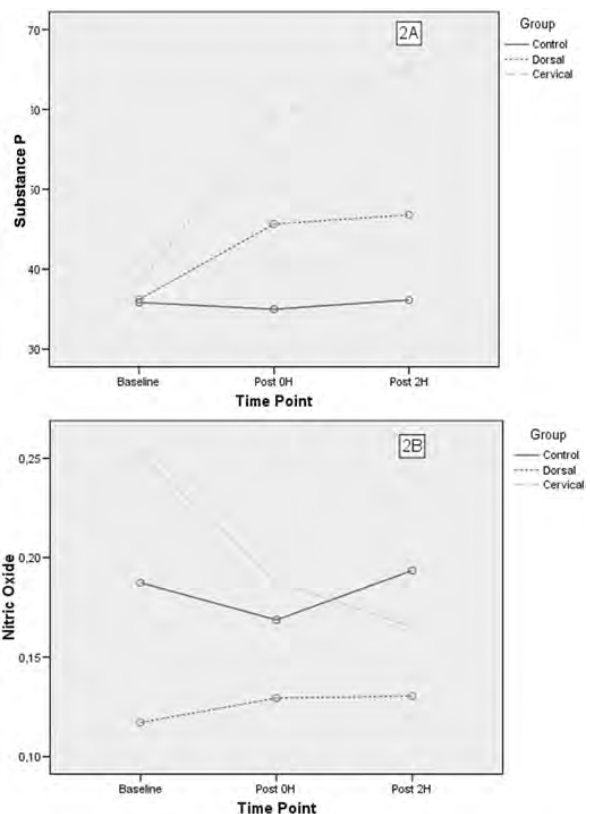


Fig. 2. Mean plots for primary measures in each group and each time point.

Please cite this article in press as: Molina-Ortega F, et al., Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception, Manual Therapy (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2014.02.007>

ARTICLE IN PRESS

4

F. Molina-Ortega et al. / Manual Therapy xxx (2014) 1–7

Table 3

Pearson Correlation coefficient between Substance P plasma concentrations and PPTs values at baseline, 0 h and 2 h after manipulation.

	Control group			Thoracic manipulation			Cervical manipulation		
	Correlation	p-value	n	Correlation	p-value	n	Correlation	p-value	n
PPT C5–C6 Baseline	-0.134	0.712	10	-0.013	0.971	10	0.391	0.264	10
PPT C5–C6 Post 0 h	-0.236	0.512	10	-0.194	0.592	10	0.584	0.076	10
PPT C5–C6 Post 2 h	-0.233	0.518	10	-0.283	0.428	10	0.451	0.191	10
PPT Epi Baseline	-0.138	0.703	10	-0.098	0.787	10	0.385	0.272	10
PPT Epi Post 0 h	-0.366	0.298	10	0.250	0.486	10	0.572	0.084	10
PPT Epi Post 2 h	-0.438	0.206	10	0.267	0.456	10	0.662*	0.037	10
PPT Tib Baseline	0.319	0.369	10	0.076	0.834	10	-0.139	0.702	10
PPT Tib Post 0 h	0.157	0.666	10	0.156	0.666	10	0.086	0.813	10
PPT Tib Post 2 h	0.298	0.402	10	0.216	0.549	10	0.079	0.827	10

* $p < 0.05$.

Abbreviations: PPT C5–C6 (pressure pain threshold at C5–C6 zygapophyseal joint); PPT Epi (pressure pain threshold at right lateral epicondyle); PPT Tib (pressure pain threshold at tibialis anterior muscle).

software packages. All analyses were performed with a 95% confidence interval ($p < 0.05$).

Test-retest reliability was assessed by taking as a reference the three measurements taken on the control group. We calculated the intraclass correlation coefficient ($ICC_{(3,1)}$) by ShROUT and Fleiss, 1979), the standard error of measurement (SEM) and the minimal detectable change (MDC). Reliability was considered poor for $ICC < 0.40$, moderate between 0.40 and 0.75, substantial between 0.75 and 0.90, and excellent when $ICC > 0.90$ (ShROUT and Fleiss, 1979).

A repeated measures multivariate analysis of variance (RM-MANOVA) was used to analyze overall effects in the primary measures (N–O and SP plasma concentrations) and secondary measures (PPT in C5–C6, epicondyle, and tibialis anterior muscles) at follow-up periods. The model was comprised of three groups, three time points, and five outcome variables. Given the high number of parameters to be estimated in relation with the number of subjects included, a multivariate mixed model (Park et al., 2001; Vossoughi et al., 2012) was also applied, correcting with the lower bound of epsilon. The normality of the distribution dependent variables at each time point was analyzed for all groups with the Kolmogorov–Smirnov test. Linearity was examined using bivariate scatter plots of observed residual values against the expected values. Box's M test was used to test the equality of the covariance matrix, and the assumption of sphericity was tested with the Mauchly test. Pairwise Bonferroni comparisons were performed to explore between-group differences. The relations between variables were analyzed through Pearson's regression and correlation. Effect sizes were calculated with η^2 for the interaction group-by-time and determination coefficient (adjusted R^2) for Pearson's regression analysis.

3. Results

Baseline characteristics of participants are presented in Table 1. There were no significant differences in variables between groups at baseline level except for N–O.

In the test-retest reliability analysis, ICCs could be considered as moderate for substance P, Nitric Oxide and PPT in epicondyle muscle, substantial for PPT C5–C6 and excellent for PPT in tibialis muscle (Table 2).

As for the overall effect, there was no a group-by-time interaction for the composite dependent variable with Pillai Trace = 0.765 ($F = 1.628$, $p = 0.103$, partial $\eta^2 = 0.383$). In the multivariate mixed model, a significant group-by-time interaction was observed for the composite variable ($F = 3.678$, $p = 0.039$, $\eta^2 = 0.214$).

Bonferroni's pairwise comparison showed a significant difference in SP plasma concentrations between the control and the cervical manipulation groups at zero hours post-treatment ($p = 0.032$) and at 2 h post-treatment ($p = 0.002$) (Fig. 2). No significant differences between groups were observed at post-treatment time points in any outcome measures.

In the regression and correlation analysis, a significant r coefficient between SP at baseline with PPT at the lateral epicondyle appeared at 2 h in the cervical manipulation group (adjusted $R^2 = 0.367$) (Table 3). N–O plasma concentrations at zero hours post-treatment showed a significant r coefficient with C5–C6 zygapophyseal joint PPT (adjusted $R^2 = 0.356$) and lateral epicondyle PPT at 2 h post-treatment (adjusted $R^2 = 0.328$) in the control group (Table 4). No other significant correlations were observed. The bivariate dispersion charts show a linearity affected by a slight elliptical or sigmoid trend, induced by some extreme value. The R^2 coefficients did not experience significant

Table 4

Pearson Correlation coefficient between nitric oxide plasma concentrations and PPTs values at baseline, 0 h and 2 h after manipulation.

	Control group			Thoracic manipulation			Cervical manipulation		
	Correlation	p-value	n	Correlation	p-value	n	Correlation	p-value	n
PPT C5–C6 Baseline	-0.231	0.522	10	0.016	0.964	10	-0.138	0.704	10
PPT C5–C6 Post 0 h	-0.490	0.150	10	0.013	0.972	10	-0.112	0.759	10
PPT C5–C6 Post 2 h	-0.654*	0.040	10	-0.143	0.693	10	-0.270	0.450	10
PPT Epi Baseline	-0.333	0.348	10	-0.152	0.676	10	-0.113	0.756	10
PPT Epi Post 0 h	-0.361	0.306	10	0.063	0.862	10	-0.188	0.603	10
PPT Epi Post 2 h	-0.634*	0.049	10	0.073	0.842	10	-0.220	0.541	10
PPT Tib Baseline	-0.002	0.996	10	0.055	0.880	10	0.543	0.105	10
PPT Tib Post 0 h	-0.248	0.490	10	0.050	0.891	10	0.418	0.229	10
PPT Tib Post 2 h	-0.030	0.935	10	-0.233	0.516	10	0.465	0.175	10

* $p < 0.05$.

Abbreviations: PPT C5–C6 (pressure pain threshold at C5–C6 zygapophyseal joint); PPT Epi (pressure pain threshold at right lateral epicondyle); PPT Tib (pressure pain threshold at tibialis anterior muscle).

Please cite this article in press as: Molina-Ortega F, et al., Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception, Manual Therapy (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2014.02.007>

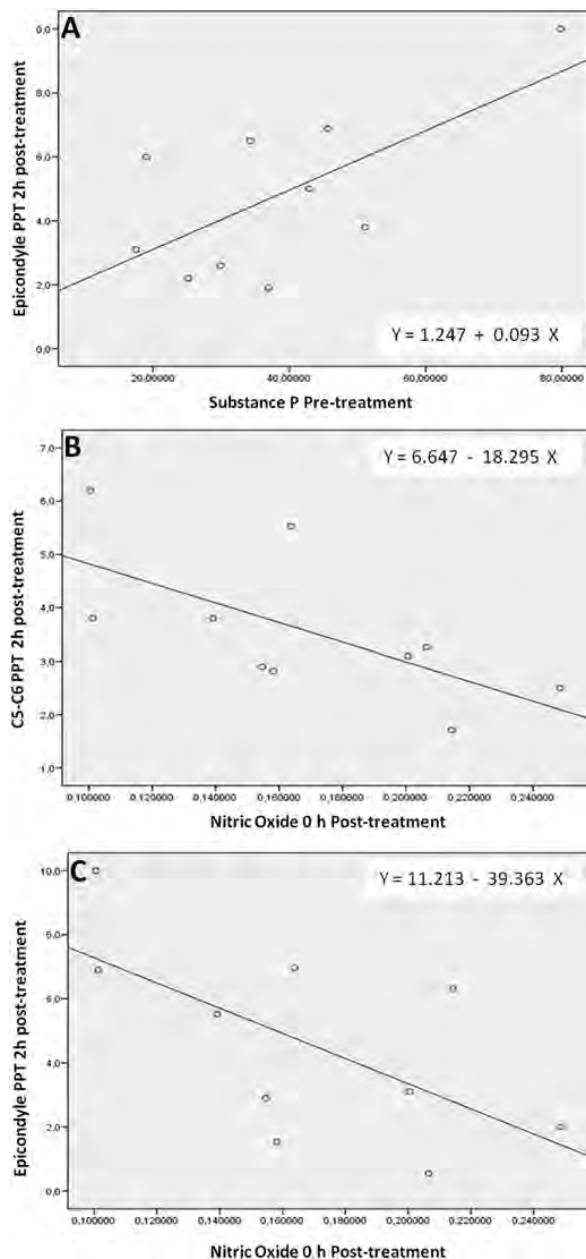


Fig. 3. Scatter plots for the relations with significant values. Linear regression equations are also displayed.

improvement when curvilinear relations were explored. For this reason, linear relations were selected in order to calculate the regression equations (Fig. 3).

4. Discussion

This study examined the effects of cervical and thoracic manipulation on substance P and nitric oxide production, as well as their anti-nociceptive role, through pressure pain threshold analysis. The main outcome of the present research was an increase in

cervical and epicondyle PPT accompanied with a rise in SP levels only after cervical manipulation, without changes in the other experimental groups analyzed.

A number of works have used PPT to study the analgesic effect of spinal manipulation but literature findings are contradictory (Fryer et al., 2004; Ruiz-Sáez et al., 2007; Thomson et al., 2009; Orakifar et al., 2012). Our results show that spinal manipulation produced an increase in PPT on C5–C6 and the lateral epicondyle in the cervical manipulation group but no changes were observed in the tibialis anterior PPT. These findings are in accordance with previous studies which analyzed the hypoalgesic effect of cervical manipulation in healthy subjects (Fernández-de-las-Peñas et al., 2007; Fernández-de-Las-Peñas et al., 2008). Plausible mechanisms for the observed anti-nociceptive role of SM include both central inhibitory and segmental responses in the pain modulatory system (Wall, 1980; Vicenzino et al., 2001; Skyba et al., 2003). Thus, segmental stimulation elicited by cervical manipulation may exert an influence on neural afferent activity, which could in turn increase the lateral epicondyle PPT.

One of the main goals of our research was the assessment of the immediate effects of spinal manipulation on N–O, as they have not received sufficient attention in the scientific literature. Morhenn et al. (2012) suggested that 15 min of massage reduce plasma N–O levels, and it has been reported that the use of acupuncture and electro-acupuncture can modify N–O levels in several situations (Zhao et al., 2000; Kim et al., 2001; Ma, 2003; Anil et al., 2012). To the best of our knowledge, this is the first research that does not show any change in serum N–O concentration for the control group or for the cervical or thoracic manipulation groups. On the other hand, it is important to take into account that several factors, such as gender, age, or phase of estrus cycle, can influence basal levels of plasma N–O in healthy people (Peinado et al., 2007; Ghasemi et al., 2010), and this could explain our differences observed in N–O plasma levels at baseline. Contrary to our results, Salamon et al. (2004) suggested that spinal manipulation augments blood flow and vasodilation by stimulating the release of N–O. Instead, we found a correlation between pre-intervention N–O levels and PPTs in the control group in the same way that the study performed by Hamza et al. (2010), who suggested that N–O concentration correlates inversely with pain. In this sense, the author states that at this early stage of inflammatory pain, N–O is analgesic in the periphery. Furthermore, low levels of N–O at the site of injury show anti-nociceptive effects (Aley et al., 1998), whereas higher concentrations have nociceptive effects. Our results indicate that N–O must be involved in the pain perception process but not in the anti-nociceptive effects of spinal manipulation.

This relationship of N–O with pain modulation might take place through the activation of cell glutamate receptors and the consequent modification of the SP release (Joad et al., 1997; Caruso et al., 2006). However, the role of SP in pain perception is still unclear. Although some researchers propose an analgesic function of SP (Wu et al., 2005), a pro-nociceptive role is suggested by others (Nakamura et al., 2012). It has been demonstrated that manual therapy modifies plasma SP concentrations through mechanical tissue stimulation (Backman et al., 2011) as a single thoracic manipulation resulted in a short-term rise of plasma SP levels (Brennan et al., 1991), although passive low velocity mobilization may reduce such levels (Backman et al., 2011). In contrast with Brennan et al. (1991), our results did not reveal a statistically significant increase of SP in the thoracic manipulation group (may be due to sample size) although an increasing trend was observed. Nevertheless, we detect a rise in SP levels just after intervention and in the 2 h follow-up for the cervical manipulation group. Furthermore, we found a positive correlation between SP concentration and PPT which suggests that high levels of serum SP before cervical manipulation imply that the subject is

ARTICLE IN PRESS

6

F. Molina-Ortega et al. / *Manual Therapy xxx (2014) 1–7*

undergoing an increase in epicondyle PPT after the SM. Therefore, our data could be interpreted as a hypoalgesic action of SP after SM in asymptomatic subjects. Similar results were obtained using a model of inflammatory pain in which supra-spinal treatment with a high dose of SP before an irritant injection reduced PPT in rats (Parenti et al., 2012). In addition, it has been hypothesized that the analgesic effect of thoracic column stimulation with electrical currents may be due to the increase of SP liberation in the dorsal horn (Linderroth et al., 1992).

4.1. Study limitations

The current work was conducted in a relatively small sample size of young and healthy subjects, and thereby our results may not be generalized and should be considered with caution. Further studies with a larger sample size and symptomatic subjects from a wide age range should be performed to further clarify the effects and the clinical benefits of the mechanical-stress-induced N–O and SP production by SM, and their role as nociceptive/antinociceptive mediators.

5. Conclusions

In summary, mechanical stimuli through cervical manipulation increased SP in asymptomatic subjects. This increase in SP was accompanied with an increase in upper-limb PPTs. Moreover, a previous SP concentration predicted larger epicondyle PPT after cervical manipulation. Thus, part of the anti-nociceptive effect of spinal manipulation was due to the action of SP. On the other hand, spinal manipulation did not modify the plasma N–O concentration. In addition, the existing correlation between N–O and upper-limb PPTs indicates that N–O plays a role in musculoskeletal pain perception. Some of our findings should be interpreted with caution, as the inherent differences in between-subject N–O levels could alter SP responses to manual therapy techniques.

References

- 41st World Medical Assembly. Declaration of Helsinki: recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Bull Pan Am Health Organ* 1990;24:606–9.
- Aley KO, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci* 1998;18:7008–14.
- Allison GT, Nagy BM, Hall T. A randomized clinical trial of manual therapy for cervico-brachial pain syndrome – a pilot study. *Man Ther* 2002;7:95–102.
- Anil A, Peker T, Göktaş T, Kilic S, Erbaş D. Importance of acupuncture on premenstrual syndrome. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2012;39:209–13.
- Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. Substance P-associated increase of intra-articular temperature and pain threshold in the arthritic TMJ. *J Orofac Pain* 1998;12(2):101–7.
- Arendt-Nielsen L, Yarnitsky D. Experimental and clinical applications of quantitative sensory testing applied to skin, muscles and viscera. *J Pain* 2009;10:556–72.
- Backman LJ, Fong G, Andersson G, Scott A, Danielson P. Substance P is a mechanoresponsive, autocrine regulator of human tenocyte proliferation. *PLoS One* 2011;6:e27209.
- Basi DL, Velly AM, Schiffman EL, Lenton PA, Besspiata DA, Rankin AM, et al. Human temporomandibular joint and myofascial pain biochemical profiles: a case-control study. *J Oral Rehabil* 2012;39(5):326–37.
- Baskurt OK, Ulker P, Meiselman HJ. Nitric oxide, erythrocytes and exercise. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011;49:175–81.
- Binti Md Isa K, Kawasaki N, Ueyama K, Sumii T, Kudo S. Effects of cold exposure and shear stress on endothelial nitric oxide synthase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412:318–22.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Braman RS, Hendrix SA. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem* 1989;61:2715–8.
- Brennan PC, Kokjohn K, Kaltinger CJ, Lohr GE, Glendening C, Hondras MA, et al. Enhanced phagocytic cell respiratory burst induced by spinal manipulation: potential role of substance P. *J Manip Physiol Ther* 1991;14:399–408.

- Caruso C, Durand D, Watanobe H, Lasaga M. NMDA and group I metabotropic glutamate receptors activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. *Neurosci Lett* 2006;393(1):60–4.
- Cauwels A, Bultinck J, Brouckaert P. Dual role of endogenous nitric oxide in tumor necrosis factor shock: induced NO tempers oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1632–40.
- Crosby ND, Weishaar CL, Winkelstein BA. Spinal neuronal plasticity is evident within 1 day after a painful cervical facet joint injury. *Neurosci Lett* 2013;542:102–6.
- Dunning J, Rushton A. The effects of cervical high-velocity low-amplitude thrust manipulation on resting electromyographic activity of the biceps brachii muscle. *Man Ther* 2009;14(5):508–13.
- Fernández-Carnero J, Cleland JA, Arbizu RL. Examination of motor and hypoalgesic effects of cervical vs thoracic spine manipulation in patients with lateral epicondylalgia: a clinical trial. *J Manip Physiol Ther* 2011;34(7):432–40.
- Fernández-de-las-Peñas C, Pérez-de-Heredia M, Brea-Rivero M, Miangolarra-Page JC. Immediate effects on pressure pain threshold following a single cervical spine manipulation in healthy subjects. *J Orthop Sports Phys Ther* 2007;37:325–9.
- Fernández-de-Las-Peñas C, Alonso-Blanco C, Cleland JA, Rodríguez-Blanco C, Alburquerque-Sendín F. Changes in pressure pain thresholds over C5–C6 zygapophyseal joint after a cervicothoracic junction manipulation in healthy subjects. *J Manip Physiol Ther* 2008;31(5):332–7.
- Fischer AA. Application of pressure algometry in manual medicine. *J Man Med* 1990;5:145–50.
- Fryer G, Carub J, McIver S. The effect of manipulation and mobilisation on pressure pain thresholds in the thoracic spine. *J Osteopath Med* 2004;7(1):8–14.
- Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. *Clin Biochem* 2010;43(1–2):89–94.
- Gross A, Miller J, D'Sylva J, Burnie SJ, Goldsmith CH, Graham N, et al. Manipulation or mobilisation for neck pain: a Cochrane Review. *Man Ther* 2010;15:315–33.
- Hamza M, Wang XM, Wu T, Brahim JS, Rowan JS, Dionne RA. Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation. *Mol Pain* 2010;6:55.
- Joad JP, Kott KS, Bonham AC. Nitric oxide contributes to substance P-induced increases in lung rapidly adapting receptor activity in guinea-pigs. *J Physiol* 1997;503(Pt 3):635–43.
- Kim YS, Kim C, Kang M, Yoo J, Huh Y. Electroacupuncture-related changes of NADPH-diaphorase and neuronal nitric oxide synthase in the brainstem of spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 2001;312:63–6.
- Larson AA, Giovengo SL, Russell JJ, Michalek JE. Changes in the concentrations of amino acids in the cerebrospinal fluid that correlate with pain in patients with fibromyalgia: implications for nitric oxide pathways. *Pain* 2000;87:201–11.
- Levy D, Strassman AM. Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. *J Neurophysiol* 2004;92:766–72.
- Linderroth B, Gazelius B, Franck J, Brodin E. Dorsal column stimulation induces release of serotonin and substance P in the cat dorsal horn. *Neurosurgery* 1992;31:89–96.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:156–67.
- Luo ZD, Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain* 2000;4:459–66.
- Ma SX. Enhanced nitric oxide concentrations and expression of nitric oxide synthase in acupuncture points/meridians. *J Altern Complement Med* 2003;9:207–15.
- Maduro de Camargo V, Alburquerque-Sendín F, Berzin F, Stefanelli VC, De Souza DP, Fernandez-de-Las-Peñas C. Immediate effects on electromyographic activity and pressure pain thresholds after a cervical manipulation in mechanical neck pain: a randomized controlled trial. *J Manip Physiol Ther* 2011;34(4):211–20.
- Mazzotta G, Sarchielli P, Gaggioli A, Gallai V. Study of pressure pain and cellular concentration of neurotransmitters related to nociception in episodic tension-type headache patients. *Headache* 1997;37(9):565–71.
- Meng W, Tobin JR, Busija DW. Glutamate-induced cerebral vasodilation is mediated by nitric oxide through N-methyl-D-aspartate receptors. *Stroke* 1995;26:857–62.
- Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66:355–474.
- Morhenn V, Beavin LE, Zak PJ. Massage increases oxytocin and reduces adrenocorticotropic hormone in humans. *Altern Ther Health Med* 2012;18:11–8.
- Nakamura Y, Une Y, Miyano K, Abe H, Hisaoka K, Morioka N, et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 evokes nociception through substance P release from primary sensory neurons. *J Neurochem* 2012;120:1036–47.
- Nakatsuka T, Chen M, Takeda D, King C, Ling J, Xing H, et al. Substance P-driven feed-forward inhibitory activity in the mammalian spinal cord. *Mol Pain* 2005;1:20.
- Nicoletti M, Neri G, Maccauro G, Tripodi D, Varvara G, Saggini A, et al. Impact of neuropeptide substance P an inflammatory compound on arachidonic acid compound generation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012;25:849–57.
- Orakifar N, Kamali F, Pirouzi S, Jamshidi F. Sacroiliac joint manipulation attenuates alpha-motoneuron activity in healthy women: a quasi-experimental study. *Arch Phys Med Rehabil* 2012;93(1):56–61.
- Parenti C, Aricò G, Ronisvalle G, Scoto GM. Supraspinal injection of substance P attenuates allodynia and hyperalgesia in a rat model of inflammatory pain. *Peptides* 2012;34:412–8.
- Park T, Park JK, Davis CS. Effects of covariance model assumptions on hypothesis tests for repeated measurements: analysis of ovarian hormone data and pituitary-ptyeromaxillary distance data. *Stat Med* 2001;20(16):2441–53.
- Peinado MA, López-Ramos JC, Camacho MV, Molina FJ, Martínez-Romero R, Hernández R, et al. Age and sex-related serum changes in nitric oxide: correlations with serological markers. *Int J Cardiol* 2007;121(1):88–90.

Please cite this article in press as: Molina-Ortega F, et al., Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception, *Manual Therapy* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2014.02.007>

ARTICLE IN PRESS

F. Molina-Ortega et al. / *Manual Therapy xxx (2014) 1–7*

7

- Quinn KP, Dong L, Golder FJ, Winkelstein BA. Neuronal hyperexcitability in the dorsal horn after painful facet joint injury. *Pain* 2010;151(2):414–21.
- Ruiz-Sáez M, Fernández-de-las-Peñas C, Blanco CR, Martínez-Segura R, García-León R. Changes in pressure pain sensitivity in latent myofascial trigger points in the upper trapezius muscle after a cervical spine manipulation in pain-free subjects. *J Manip Physiol Ther* 2007;30:578–83.
- Salamon E, Zhu W, Stefano GB. Nitric oxide as a possible mechanism for understanding the therapeutic effects of osteopathic manipulative medicine (Review). *Int J Mol Med* 2004;14:443–9.
- Salt TE, Morris R, Hill RG. Distribution of substance P-responsive and nociceptive neurones in relation to substance P-immunoreactivity within the caudal trigeminal nucleus of the rat. *Brain Res* 1983;273:217–28.
- Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol* 2007;177:3–28.
- Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull* 1979;86(2):420–8.
- Skyba DA, Radhakrishnan R, Rohlwing JJ, Wright A, Sluka KA. Joint manipulation reduces hyperalgesia by activation of monoamine receptors but not opioid or GABA receptors in the spinal cord. *Pain* 2003;106:159–68.
- Stahl C, Drewes AM. Experimental human pain models: a review of standardised methods for preclinical testing of analgesics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95(3):97–111.
- Tagawa T, Mohri M, Tagawa H, Egashira K, Shimokawa H, Kuga T, et al. Role of nitric oxide in substance P-induced vasodilation differs between the coronary and forearm circulation in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;29:546–53.
- Takuwa H, Matsuura T, Bakalova R, Obata T, Kanno I. Contribution of nitric oxide to cerebral blood flow regulation under hypoxia in rats. *J Physiol Sci* 2010;60:399–406.
- Thomsen LL, Brennum J, Iversen HK, Olesen J. Effects of nitrogen oxide donor glyceryl trinitrate on pressure pain threshold in humans. *Ugeskr Laeger* 1997;159(30):4645–8.
- Thomson O, Haig L, Mansfield L. The effects of high-velocity low amplitude thrust manipulation and mobilisation techniques on pressure pain threshold in the lumbar spine [abstract]. *Int J Osteopath Med* 2009;12:56–62.
- Tsuchiya M, Sato EF, Inoue M, Asada A. Acupuncture enhances generation of nitric oxide and increases local circulation. *Anesth Analg* 2007;104:301–7.
- Urban MO, Gebhart GF. Central mechanisms in pain. *Med Clin North Am* 1999;83:585–96.
- van Middelkoop M, Rubinstein SM, Kuijpers T, Verhagen AP, Ostelo R, Koes BW, et al. A systematic review on the effectiveness of physical and rehabilitation interventions for chronic non-specific low back pain. *Eur Spine J* 2011;20:19–39.
- Vanderweeen L, Oostendorp RB, Vaes P, Duquet W. Pressure algometry in manual therapy. *Man Ther* 1996;1:258–65.
- Vicenzino B, Paungmali A, Buratowski S, Wright A. Specific manipulative therapy treatment for chronic lateral epicondylalgia produces uniquely characteristic hypoalgesia. *Man Ther* 2001;6:205–12.
- Vossoughi M, Ayatollahi SM, Towhidi M, Ketabchi F. On summary measure analysis of linear trend repeated measures data: performance comparison with two competing methods. *BMC Med Res Methodol* 2012;12:33.
- Wall PD. The role of substantia gelatinosa as a gate control. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1980;58:205–31.
- Wu LJ, Xu H, Ko SW, Yoshimura M, Zhuo M. Feed-forward inhibition: a novel cellular mechanism for the analgesic effect of substance P. *Mol Pain* 2005;1:34.
- Zhang JS, Kraus WE, Truskey GA. Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C292–9.
- Zhao P, Huang ZN, Chen G, Cheng JS. Electro-acupuncture attenuates nitric oxide release from rat striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *Acupunct Electrother Res* 2000;25:101–7.

Please cite this article in press as: Molina-Ortega F, et al., Immediate effects of spinal manipulation on nitric oxide, substance P and pain perception, *Manual Therapy* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2014.02.007>

III

ARTÍCULO III

TISSUE DAMAGE MARKERS AFTER A SPINAL
MANIPULATION IN HEALTHY SUBJECTS: A
PRELIMINARY REPORT OF A RANDOMIZED
CONTROLLED TRIAL.

Achalandabaso A, Martínez-Amat A, Lomas-Vega R, Plaza-Manzano G,
Camacho MV, Gassó M, Hita-Contreras F, Molina-Ortega F Disease Markers

2014 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/815379>



Research Article

Tissue Damage Markers after a Spinal Manipulation in Healthy Subjects: A Preliminary Report of a Randomized Controlled Trial

A. Achalandabaso,¹ G. Plaza-Manzano,² R. Lomas-Vega,³ A. Martínez-Amat,³ M. V. Camacho,⁴ M. Gassó,⁴ F. Hita-Contreras,³ and F. Molina³

¹Centro de Fisioterapia y Psicología Soluciona, 18002 Granada, Spain

²Department of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

³Department of Health Sciences, Universidad de Jaén, Paraje Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

⁴Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Médico-Quirúrgico del Complejo Hospitalario de Jaén, Servicio Andaluz de Salud, 23007 Jaén, Spain

Correspondence should be addressed to F. Molina; fjmolina@ujaen.es

Received 25 September 2014; Accepted 10 December 2014; Published 25 December 2014

Academic Editor: Benoit Dugue

Copyright © 2014 A. Achalandabaso et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Spinal manipulation (SM) is a manual therapy technique frequently applied to treat musculoskeletal disorders because of its analgesic effects. It is defined by a manual procedure involving a directed impulse to move a joint past its physiologic range of movement (ROM). In this sense, to exceed the physiologic ROM of a joint could trigger tissue damage, which might represent an adverse effect associated with spinal manipulation. The present work tries to explore the presence of tissue damage associated with SM through the damage markers analysis. Thirty healthy subjects recruited at the University of Jaén were submitted to a placebo SM (control group; $n = 10$), a single lower cervical manipulation (cervical group; $n = 10$), and a thoracic manipulation ($n = 10$). Before the intervention, blood samples were extracted and centrifuged to obtain plasma and serum. The procedure was repeated right after the intervention and two hours after the intervention. Tissue damage markers creatine phosphokinase (CPK), lactate dehydrogenase (LDH), C-reactive protein (CRP), troponin-I, myoglobin, neuron-specific enolase (NSE), and aldolase were determined in samples. Statistical analysis was performed through a 3×3 mixed-model ANOVA. Neither cervical manipulation nor thoracic manipulation did produce significant changes in the CPK, LDH, CRP, troponin-I, myoglobin, NSE, or aldolase blood levels. Our data suggest that the mechanical strain produced by SM seems to be innocuous to the joints and surrounding tissues in healthy subjects.

1. Introduction

Spinal manipulation (SM) is a common form of intervention used by a wide range of practitioners used to relieve pain and disability of the musculoskeletal system. A precise definition of SM is still under review. The SM is frequently defined as a manual procedure that involves a directed impulse to move a joint past its physiologic ROM without exceeding its anatomical limit [1, 2]. Although its effectiveness has been demonstrated in some spinal syndromes such as [3, 4], several studies show concomitant organic complications with the application of cervical spinal manipulation (CSM) [2, 5, 6].

Mild to moderate adverse effects occur in a large proportion of patients receiving spinal manipulation [7]. Although the majority of the adverse effects are transient and nonserious [7], severe adverse events such as cerebrovascular accidents and paraplegia have been associated with SM [8]. These injuries are typically described following an upper-back CSM. Although some authors have proposed that, in the presence of a marked degree of atherosclerosis, the mechanical stretching and compression effects of rotational manipulative techniques [9] may impose a further risk factor not only for vertebrobasilar insufficiency but also for lesions of the endothelium [10], recent studies suggest that SM may induce less

arterial strain than the range of motion test when cervical rotation is examined [11].

Therefore, there are controversial data about the possibility of CSM inducing pathological mechanical stress that might in turn provoke vascular and neurological accidents [11–14]. Some evidence supports thoracic spinal manipulation (TSM) as an alternative to CSM to relieve pain and disability in the cervical spine [15]. There is no evidence of serious adverse events related to TSM. Given this situation, it is necessary to determine whether spinal manipulation is an innocuous technique.

Several proteins have been widely used in medicine as markers of tissue damage. These damage biomarkers are cell proteins or enzymes normally located inside specific cells. The detection of these proteins in serum and cerebrospinal fluid is a tell-tale of cell breakage produced by tissue damage. Proteins like creatine phosphokinase (CPK), lactate dehydrogenase (LDH), aldolase, myoglobin, and troponin-I [16] have been described as tissue damage markers in conditions such as strenuous exercise, brain injury, and heart damage [16–21], when altered levels of these markers were detected in blood samples. CPK [22] and myoglobin [16] are the most widely used blood parameters for the detection of striated muscle injury although other parameters seem to be more sensitive to the difference between cardiac muscle and skeletal muscle damage. In this respect, the skeletal muscle troponin-I subunit may be an earlier and more suitable marker for skeletal muscle damage than CPK [23] and it is widely used as a muscle damage maker after strenuous exercise [24].

On the other hand, neuron-specific enolase (NSE) is also a glycolytic enzyme, which occurs in neurons and axons and is an appropriate marker for neuronal damage [25].

Finally, C-reactive protein (CRP) is a widely employed systemic marker of inflammation and tissue damage [26].

The aim of this preliminary study is to determine the possible noxious effects of spinal manipulation. To the extent of our knowledge, this is the first work that focused on the study of SM and mechanically induced tissue damage through the analysis of damage biomarkers in blood samples.

2. Methods

2.1. Design Overview. It is randomized repeated-measures controlled trial.

2.2. Setting and Participants. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Jaén (Spain), and all subjects provided written informed consent. A total of 40 healthy students from the University of Jaén were previously selected for this study. Subjects who had one or more of the following conditions were excluded from the current study: contraindication to manipulation, history of whiplash or cervical surgery, pain related to cervical spine or arm in the previous month, subject under pharmacological treatment, subject who has practice strenuous exercise 7 days prior to the experiment, headache in the previous days, having undergone spinal manipulative therapy in the previous 2 months, or loss of standing balance. Information about eating and

physical exercise habits was obtained from participants after the experiment was conducted.

2.3. Randomization and Intervention. A number was assigned to each participant by an external consultant, who did not have any further involvement in the research. After that, a list of random numbers ranging from 0 to 30 was generated by Microsoft Excel software. The first ten numbers of this list were assigned to the control group, the next ten numbers to the cervical manipulation group, and the last ten to the thoracic manipulation group. Randomization was done by an external assessor who did not participate in the research.

Thoracic SM technique involved a high-velocity, end-range, anterior-posterior force through the elbows to the middle thoracic spine (T3-T4) on the lower thoracic (T4-T5) spine in a supine position with patient's arms crossed. In the cervical manipulation, a high-velocity, midrange left rotational force to the midcervical spine (C4) on the lower (C5) cervical spine in supine, with left rotation and right side bending.

Control participants were treated following the cervical manipulation protocol with regard to hand contact, but without intention of mobilization, nor application of tissue tension by the treating clinician.

The time devoted to HVLA thrust manipulations in the intervention groups and that to the simulated procedures in control group were similar, in order to minimize the potential for an attention effect. All the researchers were blinded to the therapist's intervention.

2.4. Blood Extraction. Serum samples were extracted before intervention, right after intervention, and two hours after manipulation by venipuncture of the cephalic vein using a Vacutainer system (Becton-Dickinson, United Kingdom). Blood was collected in two different tubes for both serum (BD Vacutainer SST II Advance, ref. 367953) and plasma (BD Vacutainer LH PST II Advance, ref. 367374) separation. After blood extraction, tubes were let stand at room temperature for one hour until the blood clotted. Afterwards, tubes were centrifuged for ten minutes at 2000 g (Avanti J-30I, Beckman Coulter, USA). Supernatant was collected from the tubes. Three serum aliquots were done for the determination of CPK, LDH, CRP, aldolase, and NSE. Plasma was divided into two different aliquots for troponin-I and myoglobin assay. All the aliquots were kept at -80°C until used.

2.5. Outcomes and Follow-Up. CPK, LDH, and aldolase serum concentrations were calculated by enzymatic assay in an OLYMPUS AU5400 Analyzer (Beckman-Coulter, USA). Troponin-I levels were measured through chemiluminescence (Dimension EXL, Siemens, Germany), as was neuron-specific enolase (LiasonAnalyzer, Dia-Sorin). CRP concentration was determined by turbidimetry assay (OLYMPUS AU5400 Analyzer, Beckman Coulter, USA). Myoglobin was determined by means of enzymatic immunoassay (Dimension EXL, Siemens, Germany). All the assays were carried out in the Ciudad de Jaén University Hospital following the manufacturer's protocol.

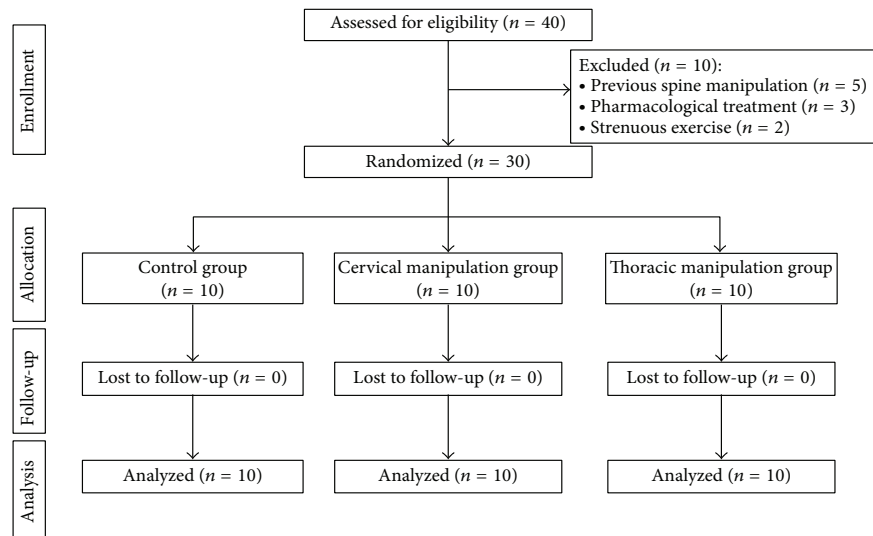


FIGURE 1: Flowchart diagram of the study.

2.6. Statistical Analysis. Continuous variables were described by means and standard deviation, and categorical variables by frequencies and percentages. Kolmogorov-Smirnov was used to verify the normal distribution of continuous variables in the groups, and Levene's test was used to confirm the homoscedasticity of the samples. One-way analysis of variance and Chi-squared test were used to prove comparability on sociodemographic baseline values. To prove the effect of the independent factor (control, thoracic, or cervical manipulation) on the dependent variables (blood concentrations) at each time point (pretreatment, zero hours posttreatment, and two hours posttreatment), a mixed-model ANOVA was employed. The hypothesis of interest was the group-by-time interaction. A separate 3×3 mixed-model ANOVA was applied for each dependent variable. In order to measure the effect size, eta-squared and Cohen's d were used for group-by-time effect and pairwise comparisons, respectively. For Cohen's d interpretation an effect size of 0.2 was considered small, 0.5 moderate, and 0.8 large [27]. Demographic and experimental data were treated with the software SPSS 19.0 (IBM, USA) and MedCalc12.7 (MedCalc, Belgium). All of the analyses were performed with a 95% confidence interval ($P < 0.05$).

3. Results

Of the 40 patients screened in the University of Jaén, a total of 30 subjects met the inclusion criteria and agreed to participate in the study. Ten participants were randomly assigned to each treatment group. Demographic data are displayed in Table I. Figure 1 shows the flowchart depicting participant recruitment and retention. No differences were observed between groups at baseline measures. Only CPR shows a difference in the limits of significance. No vitamin supplementation was

reported by the participants. They followed the Mediterranean diet [28] and had a sedentary lifestyle [29].

Descriptive data for all dependent variables in each group for each time point are shown in Table 2. Mixed-model ANOVA failed to reveal a group-by-time interaction in any of the dependent variables ($P > 0.05$). Effect sizes, measured with eta-squared, were small for all dependent variables and the interaction never explained more than 12% of the variance (Table 2). The higher effect was apparent for LDH (11.2%) and the smaller was shown for aldolase (1.9%).

The pairwise comparisons between control and both the thoracic and cervical manipulation groups show a result in the limits of statistical significance only for the comparison between control and thoracic groups in CRP at zero hours posttreatment and for myoglobin at two hours posttreatment (Table 3). However, these statistical significances have no real meaning because of the lack of statistical significance of the ANOVA. Nevertheless, the effect sizes could be considered high ($d > 0.8$) for the comparison between the control and the thoracic groups for CRP in all time points and for myoglobin at two hours posttreatment. In the comparison between control and cervical manipulation groups, only the effect size for myoglobin at two hours posttreatment could be considered high (Table 3). Troponin-I data are not shown because the value for the subjects was zero in all the time-point and groups.

4. Discussion

Spine manipulation (SM) is a manual therapy technique commonly applied, which presents benefits for patients such as an anti-inflammatory effect [30], pain relief, and reduction of drug consumption [31]. However, some studies have proposed a noxious effect of SM application. In this sense, the reports

TABLE 1: Sociodemographic characteristics and baseline measures of the groups.

Characteristic	Control <i>n</i> = 10	Thoracic <i>n</i> = 10	Cervical <i>n</i> = 10					<i>P</i> -value
Age* (years)	27.60 ± 3.22	29.80 ± 3.52	28.60 ± 3.99					0.195
BMI*	21.45 ± 2.38	23.98 ± 3.97	23.17 ± 2.94					0.206
Weight* (Kg)	66.60 ± 8.47	73.70 ± 14.33	71.20 ± 12.19					0.528
Height* (m)	1.72 ± 0.07	1.75 ± 0.06	1.75 ± 0.12					0.301
CPK* (U/L)	74.90 ± 17.21	72.00 ± 13.73	65.10 ± 14.78					0.353
LDH* (U/L)	276.03 ± 57.30	297.20 ± 52.66	275.90 ± 43.40					0.573
Enolase* (ng/mL)	9.48 ± 1.81	9.09 ± 1.50	9.57 ± 3.26					0.887
CPR* (mg/L)	1.41 ± 1.00	0.56 ± 0.30	1.48 ± 1.16					0.056
Aldolase* (U/L)	3.09 ± 1.60	3.10 ± 1.06	3.13 ± 1.02					0.998
Myoglobin* (ng/mL)	50.76 ± 31.39	36.80 ± 10.81	35.40 ± 20.87					0.262
Gender†	Male	6	60.0%	5	50.0%	5	50.0%	0.875
	Female	4	40.0%	5	50.0%	5	50.0%	

BMI: body mass index; CPK: creatine phosphokinase; LDH: lactate dehydrogenase; CPR: C-reactive protein.

*Continuous variables are expressed as a mean ± standard deviation. *P* values correspond to one-way ANOVA test.

†Categorical variables are expressed as frequencies and percentages. *P* values correspond to Chi-squared test.

TABLE 2: Blood concentrations for all groups at each follow-up period. Statistical significance and effect size for group-by-time interaction.

		Pre-T Mean ± SD	Post-0 H Mean ± SD	Post 2 H Mean ± SD	<i>P</i> value	Eta ²
CPK (U/L)	Control	74.90 ± 17.21	74.10 ± 17.12	74.40 ± 16.57	0.425	0.065
	Thoracic	72.00 ± 13.73	72.10 ± 16.00	71.10 ± 19.09		
	Cervical	65.10 ± 14.78	65.20 ± 16.29	68.10 ± 16.38		
LDH (U/L)	Control	276.03 ± 57.30	283.43 ± 44.29	268.11 ± 47.02	0.167	0.112
	Thoracic	297.20 ± 52.66	294.70 ± 52.69	289.80 ± 67.36		
	Cervical	275.90 ± 43.40	276.00 ± 28.20	302.80 ± 82.64		
Enolase (ng/mL)	Control	9.48 ± 1.81	8.90 ± 1.24	8.86 ± 1.29	0.235	0.100
	Thoracic	9.09 ± 1.50	9.52 ± 1.41	9.42 ± 2.95		
	Cervical	9.57 ± 3.26	9.23 ± 1.97	11.57 ± 6.17		
CPR (mg/L)	Control	1.41 ± 1.00	1.61 ± 1.02	1.53 ± 1.19	0.486	0.058
	Thoracic	0.56 ± 0.30	0.50 ± 0.27	0.50 ± 0.30		
	Cervical	1.48 ± 1.16	1.48 ± 1.22	1.47 ± 1.15		
Aldolase (U/L)	Control	3.09 ± 1.60	3.36 ± 1.37	3.50 ± 1.57	0.859	0.019
	Thoracic	3.10 ± 1.06	3.23 ± 1.25	3.17 ± 1.37		
	Cervical	3.13 ± 1.02	3.29 ± 0.90	3.63 ± 1.38		
Myoglobin (ng/mL)	Control	50.76 ± 31.39	52.18 ± 23.63	70.20 ± 43.56	0.312	0.083
	Thoracic	36.80 ± 10.81	38.30 ± 10.80	36.60 ± 10.60		
	Cervical	35.40 ± 20.87	35.80 ± 19.62	39.10 ± 22.19		

Pre-T: pretreatment values; Post-0 H: values 0 H after intervention; Post-2 H: values 2 H after intervention; CPK: creatine phosphokinase; LDH: lactate dehydrogenase; CPR: C-reactive protein.

on its effects on inducing tissue injuries are controversial, as it has been related to adverse events [7, 12, 32, 33]. The literature points at catastrophic manual-therapy-induced adverse events being dependent on tissue damage. In this sense, the detection of some proteins in blood samples has been revealed as useful in some musculoskeletal and neurological conditions [34–36] to detect tissue damage. Thus, the present work is focused on the determination of biological damage markers in blood samples after a cervical or a thoracic

manipulation, in order to corroborate whether or not spinal manipulation causes measurable tissue damage.

Adverse events from manual therapy range from the catastrophic, such as cervical artery dissection producing a stroke, through bruising to muscle soreness that could be regarded as a minor, and expected, consequence of treatment [37]. Rubinstein et al. reported that 72% of adverse events occurred after the first treatment [38]. Most adverse events reported by manual therapy patients are thought to be benign and

TABLE 3: Mean differences between control and both the thoracic and the cervical groups.

		Control-thoracic				Control-cervical			
		Mean difference	95% CI	P value	Cohen-D	Mean difference	95% CI	P value	Cohen-D
CPK (U/L)	Pretreatment	2.90	(-14.57; 20.37)	1.000	0.19	9.80	(-7.67; 27.27)	0.491	0.61
	Post 0 H	2.00	(-16.81; 20.81)	1.000	0.12	8.90	(-9.91; 27.71)	0.713	0.53
	Post 2 H	3.30	(-16.55; 23.15)	1.000	0.18	6.30	(-13.55; 26.15)	1.000	0.38
LDH (U/L)	Pretreatment	-21.17	(-79.90; 37.55)	1.000	0.38	0.13	(-58.60; 58.85)	1.000	0.00
	Post 0 H	-11.27	(-60.29; 37.75)	1.000	0.23	7.43	(-41.59; 56.45)	1.000	0.20
	Post 2 H	-21.69	(-98.48; 55.11)	1.000	0.37	-34.69	(-111.48; 42.11)	0.777	0.52
Enolase (ng/mL)	Pretreatment	0.39	(-2.26; 3.04)	1.000	0.23	-0.09	(-2.74; 2.56)	1.000	0.04
	Post 0 H	-0.62	(-2.42; 1.17)	1.000	0.47	-0.33	(-2.13; 1.46)	1.000	0.20
	Post 2 H	-0.56	(-5.15; 4.03)	1.000	0.24	-2.71	(-7.30; 1.88)	0.431	0.61
CRP (mg/L)	Pretreatment	0.85	(-0.18; 1.88)	0.136	1.14	-0.07	(-1.10; 0.96)	1.000	0.07
	Post 0 H	1.11	(0.05; 2.18)	0.039	1.49	0.13	(-0.93; 1.20)	1.000	0.12
	Post 2 H	1.03	(-0.09; 2.14)	0.078	1.18	0.06	(-1.06; 1.17)	1.000	0.05
Aldolase (U/L)	Pretreatment	-0.01	(-1.44; 1.43)	1.000	0.00	-0.04	(-1.47; 1.40)	1.000	0.03
	Post 0 H	0.13	(-1.23; 1.49)	1.000	0.10	0.07	(-1.29; 1.43)	1.000	0.06
	Post 2 H	0.33	(-1.32; 1.98)	1.000	0.22	-0.13	(-1.78; 1.52)	1.000	0.09
Myoglobin (ng/mL)	Pretreatment	13.96	(-11.89; 39.80)	0.538	0.59	15.36	(-10.49; 41.20)	0.423	0.58
	Post 0 H	13.88	(-7.57; 35.34)	0.331	0.76	16.38	(-5.07; 37.84)	0.185	0.75
	Post 2 H	33.60	(0.63; 66.57)	0.045*	1.06	31.10	(-1.87; 64.07)	0.069	0.90

Pre-T: pretreatment values; Post-0 H: values 0 H after intervention; Post-2 H: values 2 H after intervention; CPK: creatine phosphokinase; LDH: lactate dehydrogenase; CRP: C-reactive protein.

*Trend to statistical significance.

transient and are often unknown to the practitioner unless patients show observable signs (e.g., loss of motion or neurological deficits) or report pain or discomfort [39]. A recent systematic review shows that nearly half of patients experience adverse events after manual therapy. These adverse events are short-lived and minor, and most will occur within 24 hours and resolve within 72 hours. The relative risk of these adverse events is similar for manual therapy plus exercise treatment and for sham/passive/control interventions [37].

The biomarkers used in the study are generally used to detect tissue damage. Creatine phosphokinase (CPK) is an intracellular enzyme related to energy metabolism, and its level in serum has been extensively used as a diagnostic marker for muscle injury [18]. Myoglobin and troponin-I are sensitive markers for skeletal muscle or cardiac muscle damage [19]. Both aldolase and lactate dehydrogenase (LDH) are biomarkers for general tissue damage. The presence of neuron-specific enolase (NSE) in plasma samples is used as a diffuse neuronal damage marker [40]. The C-reactive protein (CRP) is a nonspecific marker of inflammation. In fact, Huang et al. showed that elevated mechanical strain on vessels could induce the local expression of proinflammatory cytokines like CRP [41]. These parameters had been extensively used in research in order to analyze the effect of active physical therapy in the expression of tissue damage markers [42, 43]. After the analysis of seven tissue damage markers, our data do not show any significant differences in CPK, LDH, troponin-I, myoglobin, aldolase, NSE, and CRP

concentrations. A mixed-model ANOVA failed to reveal a group-by-time interaction in any of the dependent variables ($P > 0.05$). The pairwise comparisons between the control and both the thoracic and the cervical manipulation groups show lack of statistical significance except for two comparisons in the limit of statistical significance (which lack real meaning). The relatively high effect size found in the comparison of CRP levels between the control group and the thoracic manipulation group was already apparent at pretreatment and did not increase significantly in the two posttreatment measurements. The behavior of these parameters suggests that the mechanical stimulus induced by spinal manipulation alone is not enough to provoke cell damage or tissue breakage in healthy subjects. These data agree with other works that show no alteration in pathologic blood vessels after a cervical manipulation [44]. Nevertheless, Huang et al. showed that mechanical strain increased CRP expression in the saphenous vein in a strength-dependent manner [41]. Rather than an episode of mechanical stretch, some studies propose that a repetitive mechanical stress was needed to induce microstructural damage in vessels [45]. Moreover, studies demonstrated that the mechanical load of the vertebral artery during SM application was almost an order of magnitude lower than the strain required to cause its mechanical disruption [14].

The findings of the present study contradict those of previous studies on other manual therapies modalities. Danneskjold-Samsøe et al. identified an increase on serum myoglobin

after a deep massage [46, 47]. Arkko et al. also found increases of serum CPK and LDH concentrations [48]. This contradiction may be due to differences between modalities or because the studies of Danneskiold-Samsøe and Arkko were conducted on nonhealthy subjects whereas our subjects were healthy. Moreover, the deep massage protocol used in these studies differs from our manipulation technique in the application time of the treatment protocol. The process for a single spinal manipulation takes a few seconds but, in contrast, massage protocol takes some minutes. It is therefore possible that the long time during which mechanical force was directly applied to tissues could explain the observed increase in myoglobin, CPK, and LDH in these studies [4, 38, 39].

After the manipulation, two of the subjects suffered syncope. Both belonged to the thoracic manipulative group. It is likely that syncope after spinal manipulative therapy is not related to tissue damage and that such adverse event may be explained by other reasons.

Strengths and Limitations of the Study. First, the sample was small due to methodological issues, making it difficult to generalize our results. Second, it was not possible to blind the clinician or the subjects due to the nature of the intervention, which constitutes a risk of bias. Third, the present study was conducted on asymptomatic subjects, so it is not possible to extrapolate the present findings to a symptomatic population.

5. Conclusions

Our data show no changes in any of the studied damage markers. Although this study examined the outcomes in an asymptomatic population, lower cervical and thoracic manipulative techniques seem to be safe manual therapies techniques which cause no harm to the health of the subject. These data may be used as evidence of the safe application of spinal manipulation to healthy subjects. Further studies with a large sample size and a patient population are needed to corroborate the innocuous effects of spinal manipulation.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgment

The authors wish to thank all the professionals of the Clinical Analysis Service of the Hospital Ciudad de Jaén (Jaén, Spain) for collaborating in this study.

References

- [1] D. W. Evans and N. Lucas, "What is "manipulation"? A reappraisal," *Manual Therapy*, vol. 15, no. 3, pp. 286–291, 2010.
- [2] M. I. Gatterman and D. T. Hansen, "Development of chiropractic nomenclature through consensus," *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, vol. 17, no. 5, pp. 302–309, 1994.
- [3] J. J. Kuczynski, B. Schwieterman, K. Columber, D. Knupp, L. Shaub, and C. E. Cook, "Effectiveness of physical therapist administered spinal manipulation for the treatment of low back pain: a systematic review of the literature," *International Journal of Sports Physical Therapy*, vol. 7, no. 6, pp. 647–662, 2012.
- [4] R. Martínez-Segura, C. Fernández-de-las-Peñas, M. Ruiz-Sáez, C. López-Jiménez, and C. Rodríguez-Blanco, "Immediate effects on neck pain and active range of motion after a single cervical high-velocity low-amplitude manipulation in subjects presenting with mechanical neck pain: a randomized controlled trial," *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, vol. 29, no. 7, pp. 511–517, 2006.
- [5] S. Haldeman, F. J. Kohlbeck, and M. McGregor, "Risk factors and precipitating neck movements causing vertebral artery dissection after cervical trauma and spinal manipulation," *Spine*, vol. 24, no. 8, pp. 785–794, 1999.
- [6] C. Stevinson, W. Honan, B. Cooke, and E. Ernst, "Neurological complications of cervical spine manipulation," *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 94, no. 3, pp. 107–110, 2001.
- [7] E. Ernst, "Adverse effects of spinal manipulation: a systematic review," *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 100, no. 7, pp. 330–338, 2007.
- [8] M. Paciaroni and J. Bogousslavsky, "Cerebrovascular complications of neck manipulation," *European Neurology*, vol. 61, no. 2, pp. 112–118, 2009.
- [9] S. Wuest, B. Symons, T. Leonard, and W. Herzog, "Preliminary report: biomechanics of vertebral artery segments C1–C6 during cervical spinal manipulation," *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, vol. 33, no. 4, pp. 273–278, 2010.
- [10] B. Cagnie, E. Barbaix, E. Vinck, K. D'Herde, and D. Cambier, "Atherosclerosis in the vertebral artery: an intrinsic risk factor in the use of spinal manipulation?" *Surgical and Radiologic Anatomy*, vol. 28, no. 2, pp. 129–134, 2006.
- [11] B. Symons and W. Herzog, "Cervical artery dissection: a biomechanical perspective," *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*, vol. 57, no. 4, pp. 276–278, 2013.
- [12] E. Ernst, "Vascular accidents after neck manipulation: cause or coincidence?" *International Journal of Clinical Practice*, vol. 64, no. 6, pp. 673–677, 2010.
- [13] S. Haldeman, F. J. Kohlbeck, and M. McGregor, "Unpredictability of cerebrovascular ischemia associated with cervical spine manipulation therapy: a review of sixty-four cases after cervical spine manipulation," *Spine*, vol. 27, no. 1, pp. 49–55, 2002.
- [14] B. P. Symons, T. Leonard, and W. Herzog, "Internal forces sustained by the vertebral artery during spinal manipulative therapy," *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, vol. 25, no. 8, pp. 504–510, 2002.
- [15] C. Fernández-de-las-Peñas, C. Alonso-Blanco, J. A. Cleland, C. Rodríguez-Blanco, and F. Albuquerque-Sendín, "Changes in pressure pain thresholds over C5–C6 zygapophyseal joint after a cervicothoracic junction manipulation in healthy subjects," *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, vol. 31, no. 5, pp. 332–337, 2008.
- [16] P. Brancaccio, G. Lippi, and N. Maffulli, "Biochemical markers of muscular damage," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 48, no. 6, pp. 757–767, 2010.
- [17] M. Kaundal and S. Sharma, "Analysis of isoproterenol-induced changes in gastrocnemius muscle and serum lactate dehydrogenase expression in mice," *Singapore Medical Journal*, vol. 52, no. 4, pp. 274–282, 2011.
- [18] J. Nie, T. K. Tong, K. George, F. H. Fu, H. Lin, and Q. Shi, "Resting and post-exercise serum biomarkers of cardiac and skeletal muscle damage in adolescent runners," *Scandinavian*

Disease Markers

7

- Journal of Medicine and Science in Sports*, vol. 21, no. 5, pp. 625–629, 2011.
- [19] F. A. Van Nieuwenhoven, A. H. Kleine, K. W. H. Wodzig et al., “Discrimination between myocardial and skeletal muscle injury by assessment of the plasma ratio of myoglobin over fatty acid-binding protein,” *Circulation*, vol. 92, no. 10, pp. 2848–2854, 1995.
- [20] E. S. D. Dos Santos, M. P. Pereira, L. Minuzzo et al., “Electrical cardioversion and myocardial injury: evaluation by new cardiac injury markers,” *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 86, no. 3, pp. 191–197, 2006.
- [21] E. G. Zandbergen, R. J. de Haan, and A. Hijdra, “Systematic review of prediction of poor outcome in anoxic-ischaemic coma with biochemical markers of brain damage,” *Intensive Care Medicine*, vol. 27, no. 10, pp. 1661–1667, 2001.
- [22] M. F. Baird, S. M. Graham, J. S. Baker, and G. F. Bickerstaff, “Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery,” *Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 2012, Article ID 960363, 13 pages, 2012.
- [23] S. Sorichter, J. Mair, A. Koller et al., “Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage,” *Journal of Applied Physiology*, vol. 83, no. 4, pp. 1076–1082, 1997.
- [24] S. Sorichter, J. Mair, A. Koller et al., “Release of muscle proteins after downhill running in male and female subjects,” *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, vol. 11, no. 1, pp. 28–32, 2001.
- [25] P. Gradisek, J. Osredkar, M. Korsic, and B. Kremzar, “Multiple indicators model of long-term mortality in traumatic brain injury,” *Brain Injury*, vol. 26, no. 12, pp. 1472–1481, 2012.
- [26] M. B. Pepsy and G. M. Hirschfield, “C-reactive protein: a critical update,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 111, no. 12, pp. 1805–1812, 2003.
- [27] J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioural Sciences*, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ, USA, 1988.
- [28] L. Serra-Majem, A. Trichopoulou, J. N. De La Cruz et al., “International Task Force on the Mediterranean Diet. Does the definition of the Mediterranean diet need to be updated?” *Public Health Nutrition*, vol. 7, no. 7, pp. 927–929, 2004.
- [29] R. R. Pate, J. R. O’Neill, and F. Lobelo, “The evolving definition of “sedentary,”” *Exercise and Sport Sciences Reviews*, vol. 36, no. 4, pp. 173–178, 2008.
- [30] R. A. Roy, J. P. Boucher, and A. S. Comtois, “Inflammatory response following a short-term course of chiropractic treatment in subjects with and without chronic low back pain,” *Journal of Chiropractic Medicine*, vol. 9, no. 3, pp. 107–114, 2010.
- [31] L. G. F. Giles and R. Muller, “Chronic spinal pain: a randomized clinical trial comparing medication, acupuncture, and spinal manipulation,” *Spine*, vol. 28, no. 14, pp. 1490–1503, 2003.
- [32] F. C. Albuquerque, Y. C. Hu, S. R. Dashti et al., “Craniocervical arterial dissections as sequelae of chiropractic manipulation: patterns of injury and management,” *Journal of Neurosurgery*, vol. 115, no. 6, pp. 1197–1205, 2011.
- [33] J. J. Hebert, N. J. Stomski, S. D. French, and S. M. Rubinstein, “Serious adverse events and spinal manipulative therapy of the low back region: a systematic review of cases,” *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, 2013.
- [34] K. L. Flann, P. C. Lastayo, D. A. McClain, M. Hazel, and S. L. Lindstedt, “Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain?” *Journal of Experimental Biology*, vol. 214, no. 4, pp. 674–679, 2011.
- [35] M. Herrmann, N. Curio, S. Jost et al., “Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury,” *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 70, no. 1, pp. 95–100, 2001.
- [36] A. J. McKune, S. J. Semple, and E. M. Peters-Futre, “Acute exercise-induced muscle injury,” *Biology of Sport*, vol. 29, no. 1, pp. 3–10, 2012.
- [37] D. Carnes, T. S. Mars, B. Mullinger, R. Froud, and M. Underwood, “Adverse events and manual therapy: a systematic review,” *Manual Therapy*, vol. 15, no. 4, pp. 355–363, 2010.
- [38] S. M. Rubinstein, C. Leboeuf-Yde, D. L. Knol, T. E. de Koekkoek, C. E. Pfeifle, and M. W. van Tulder, “The benefits outweigh the risks for patients undergoing chiropractic care for neck pain: a prospective, multicenter, cohort study,” *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, vol. 30, no. 6, pp. 408–418, 2007.
- [39] L. C. Carlesso, J. Cairney, L. Dolovich, and J. Hoogenes, “Defining adverse events in manual therapy: an exploratory qualitative analysis of the patient perspective,” *Manual Therapy*, vol. 16, no. 5, pp. 440–446, 2011.
- [40] S.-Y. Lee, Y.-C. Choi, J.-H. Kim, and W.-J. Kim, “Serum neuron-specific enolase level as a biomarker in differential diagnosis of seizure and syncope,” *Journal of Neurology*, vol. 257, no. 10, pp. 1708–1712, 2010.
- [41] G. Huang, C. Luo, X. Gu et al., “Mechanical strain induces expression of C-reactive protein in human blood vessels,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 330, no. 1, pp. 206–211, 2009.
- [42] H. Alexanderson, C. H. Stenström, G. Jenner, and I. Lundberg, “The safety of a resistive home exercise program in patients with recent onset active polymyositis or dermatomyositis,” *Scandinavian Journal of Rheumatology*, vol. 29, no. 5, pp. 295–301, 2000.
- [43] H. Alexanderson, L. A. Munters, M. Dastmalchi et al., “Resistive home exercise in patients with recent-onset polymyositis and dermatomyositis—a randomized controlled single-blinded study with a 2-year followup,” *Journal of Rheumatology*, vol. 41, no. 6, pp. 1124–1132, 2014.
- [44] S. Wynd, T. Anderson, and G. Kawchuk, “Effect of cervical spine manipulation on a pre-existing vascular lesion within the canine vertebral artery,” *Cerebrovascular Diseases*, vol. 26, no. 3, pp. 304–309, 2008.
- [45] N. Austin, L. M. DiFrancesco, and W. Herzog, “Microstructural damage in arterial tissue exposed to repeated tensile strains,” *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, vol. 33, no. 1, pp. 14–19, 2010.
- [46] B. Danneskiold-Samsøe, E. Christiansen, B. Lund, and R. B. Andersen, “Regional muscle tension and pain (“fibrositis”). Effect of massage on myoglobin in plasma,” *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 17–20, 1983.
- [47] B. Danneskiold-Samsøe, E. Christiansen, and R. Bach Andersen, “Myofascial pain and the role of myoglobin,” *Scandinavian Journal of Rheumatology*, vol. 15, no. 2, pp. 174–178, 1986.
- [48] P. J. Arkko, A. J. Pakarinen, and O. Kari Koskinen, “Effects of whole body massage on serum protein, electrolyte and hormone concentrations, enzyme activities, and hematological parameters,” *International Journal of Sports Medicine*, vol. 4, no. 4, pp. 265–267, 1983.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los datos obtenidos de las publicaciones que conforman esta tesis, podemos afirmar que en nuestra muestra de sujetos sanos:

– La aplicación de una manipulación vertebral cervical produce un incremento significativo de la concentración plasmática de neurotensina, oxitocina, cortisol y sustancia P (Artículos I y II).

– La aplicación de una manipulación vertebral torácica produce un incremento significativo de la concentración plasmática de neurotensina y oxitocina (Artículo I).

– La aplicación de una manipulación vertebral cervical o torácica no produce cambios significativos en la concentración plasmática de óxido nítrico (Artículo II).

– La aplicación de una manipulación vertebral cervical produce un incremento significativo de los umbrales de dolor a la presión locales (sobre la proyección de la articulación cigapofisaria C5-C6 y sobre el epicóndilo lateral) (Artículo II).

– La concentración de sustancia P previa a la manipulación cervical es directamente dependiente de los cambios que se producen en los umbrales de dolor a la presión tras la intervención de una manera positiva (Artículo II).

– La aplicación de una manipulación vertebral cervical o torácica no produce cambios significativos en la concentración en suero de creatinfosfoquinasa, lactato deshidrogenasa, proteína C reactiva, enolasa neuro-específica, aldolasa, troponina o mioglobina (Artículo III). Hay una tendencia a la significación en el grupo de manipulación torácica en los niveles de CRP y mioglobina.

Conclusión general:

Los resultados de la presente tesis doctoral muestran que el empleo de una manipulación vertebral cervical, o torácica en sujetos sanos produce la liberación de

sustancias químicas que pueden relacionarse con mecanismos inhibitorios descendentes del dolor sin producir la liberación de químicos que se relacionan con una lesión histológica.

AGRADECIMIENTOS

Todo trabajo conlleva una gran cantidad de motivación y esfuerzo para poderse realizar. Cuanto mayor es la magnitud del trabajo, mayor debe de ser el apoyo y el sacrificio de las personas que te rodean.

Esta tesis doctoral no es una excepción. De ahí mi deseo de expresar mi más sincero agradecimiento a quienes directa e indirectamente han participado en su ejecución.

En primer lugar agradezco al Dr. Antonio Martínez Amat y a D. Gustavo Plaza Manzano por poner en común sus conocimientos, puesto que de esa puesta en común ha salido el proyecto que tiene como culminación la presente tesis. Así como a todos los participantes en este proyecto por su gran generosidad y capacidad de trabajo.

Asimismo sin la dedicación, comentarios y aportaciones de mis directores, Dr. Antonio Martínez Amat y Dr. Francisco Javier Molina Ortega, es seguro que esta tesis hubiese sido un trabajo imposible de realizar, por eso quiero agradecerles su esfuerzo y confianza en que podríamos sacar esta tarea adelante.

Al Dr. Fidel Contreras Hita por su apoyo y comprensión en los momentos difíciles por los que todo proyecto pasa, y como no, este no podía ser una excepción.

Al Dr. Rafael Lomas Vega por su inestimable ayuda en la comprensión de los resultados obtenidos.

Al área de Fisioterapia de la Universidad de Jaén por su apoyo y facilitación de todos los medios disponibles.

A D. Antonio J. Ramos-Morcillo por su dedicación en el proyecto.

También me gustaría hacer una mención especial a las instituciones que han colaborado en el procesamiento de las muestras, el Servicio de Análisis Clínicos Hospital Médico-Quirúrgico del Complejo Hospitalario de Jaén y el Parque Tecnológico de las Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.

A mi familia y amigos que han estado ahí para apoyarme en todo los momentos de mi vida y especialmente en estos años de estudio e investigación.

Especialmente a Virginia, mi compañera y confidente, la persona que da coherencia a mi vida. Gracias por tu comprensión y paciencia, por dejar que me apoye sobre ti y animarme en los momentos de flaqueza. Y sobretodo gracias por Lucía.

A todos ellos, muchas gracias.