



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Máster en Investigación en Ciencias de la Salud: Neurobiología

**ESTUDIOS NEUROFISIOLÓGICOS DE CONDUCCIÓN NERVIOSA
MOTORA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA Y EN LA INVESTIGACIÓN**

Trabajo Fin de Master para optar al grado de Máster en Investigación en
Ciencias de la Salud en el área de Neurobiología.

Presentado por Johanna Barón Sánchez.

Bajo la dirección del Dr. Manuel Garrosa

Valladolid

Septiembre de 2012

INDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|--------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | pág 4 |
| 1. GENERACIÓN Y CONDUCCIÓN DE POTENCIALES EN EL SISTEMA NERVIOSO..... | pág 6 |
| 1.1. Potencial de reposo | |
| 1.2. Propiedades eléctricas activas y pasivas de las neuronas | |
| 1.3. Potencial de Acción | |
| 2. ESTUDIOS NEUROFISIOLÓGICOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA..... | pág 13 |
| 2.1. Revisión Histórica | |
| 2.2. Estudios de conducción nerviosa | |
| 2.3. Estudios de conducción nerviosa motora | |
| 2.4. Aspectos técnicos del estudio de conducción nerviosa motora | |
| 2.5. Estimulación y registro | |
| 2.6. Valoración del estudio de conducción nerviosa motora | |
| 2.6.1. Latencia | |
| 2.6.2. Amplitud | |
| 2.6.3. Duración | |
| 2.6.4. Velocidad de conducción motora | |
| 2.7. Estudios de conducción nerviosa motora: usos y limitaciones | |

3. ESTUDIO ELECTRODIAGNÓSTICO MOTOR NO INVASIVO APLICADO A LA INVESTIGACIÓN COMPARADO CON EL ANÁLISIS DE LA HUELLA (FOOT-PRINT ANALYSIS).....pág 26

3.1. Registro electrodiagnóstico no invasivo

3.2 Análisis de la huella. (Foot-print analysis)

II. OBJETIVOS.....pág 30

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....pág 31

IV. RESULTADOS.....pág 34

V. DISCUSIÓN.....pág 36

VI. CONCLUSIONES.....pág 38

VII. BIBLIOGRAFÍA.....pág 39

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la práctica clínica, principalmente en el transcurso de los siglos IX y XX, se ha demostrado la gran relevancia y efectividad que tienen los estudios neurofisiológicos (EN) en el diagnóstico, pronóstico e investigación del estado anatómico y funcional del sistema nervioso.

Kothari¹ et al demostraron que aplicando los métodos neurofisiológicos, se cambiaba el diagnóstico inicial del paciente en un 37%, y en el 55 %, se modificaba el tratamiento médico como consecuencia de estos, lo que puede repercutir en un mejor diagnóstico y tratamiento de los pacientes, disminuyendo así la morbilidad secundaria.

Los EN complementan la exploración clínica proporcionando precisión y objetividad. Así también delimitan gran variedad de cambios patológicos que pueden de otro modo no ser detectados.

El electrodiagnóstico, como extensión de la exploración neurológica, se sirve de los mismos principios anatómicos de localización, para evidenciar las alteraciones del sistema nervioso, investigando el compromiso motor y sensitivo².

La interpretación adecuada y completa de los hallazgos electrofisiológicos requiere, por lo tanto, un conocimiento preciso de la neuroanatomía. Además,

de ello también depende que la técnica se realice adecuadamente, ya que la localización de los músculos esqueléticos superficiales y de los nervios periféricos es indispensable en la colocación de los electrodos de registro y de estimulación ³.

Los estudios de conducción nerviosa tienen una aplicación importante en el estudio del aparato neuro-muscular, tanto en clínica como en investigación en especial en las afecciones de plexos nerviosos, nervios periféricos y en el diagnóstico diferencial de estas.

Así por ejemplo en las últimas décadas se han desarrollado numerosos estudios que han incrementado el conocimiento de los procesos moleculares y celulares que ocurren después de la lesión de un nervio periférico y en consecuencia se han puesto en práctica diversas técnicas quirúrgicas, rehabilitadoras y biológicas, dirigidas a la reparación de este, donde los estudios de conducción nerviosa han sido indispensables para el seguimiento objetivo de la recuperación neuronal y el avance científico de dichas técnicas .

1. GENERACIÓN Y CONDUCCIÓN DE POTENCIALES EN EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso lleva a cabo la transferencia de información como consecuencia de cambios eléctricos que producen modificaciones sobre la membrana celular de la neurona. Estas variaciones son posibles debido a la capacidad excitatoria que poseen las células, en especial la neurona³.

1.1. POTENCIAL DE REPOSO

La neurona está dotada de una membrana plasmática que le permite, entre otras cosas, mantener comunicación con las células de su vecindad.

Esta membrana está cargada eléctricamente, gracias a la distribución de iones tanto positivos (aniones) como negativos (cationes), en la superficie externa e interna de dicha membrana⁴. La especial propiedad de semipermeabilidad que posee la membrana celular, juega un papel primordial en el intercambio iónico, donde su bicapa lipídica actúa como condensador (es capaz de separar cargas distintas en ambos lados y no permite que atraviesen la membrana) y los canales o poros transmembranosos actúan como resistencia al flujo iónico⁵. Así pues, el cierre o apertura de los canales determina el potencial de membrana.

El espacio intracelular de una neurona en reposo está cargado negativamente respecto al espacio extracelular, esto es así por que existe un exceso de cargas negativas predominantemente en la cara interna de la membrana y un

exceso de cargas positivas en la proximidad de la cara externa. Estas cargas permanecen alejadas entre sí, gracias a la semipermeabilidad de la membrana. Esta separación de cargas es la responsable del *potencial de reposo* de la membrana celular.

El potencial de membrana es el resultado de la diferencia del potencial entre el interior y exterior celular, en cualquier estado de activación neuronal, incluido el reposo. En la mayoría de las neuronas este potencial intracelular es de -60 a -70 mV, estableciéndose como 0 el potencial del líquido extracelular ⁴⁻⁵.

Cuando se produce una disminución de la negatividad en el potencial de membrana (es decir que el potencial se acerque al cero) se dice que la célula se ha despolarizado, por el contrario cuando hay un aumento en la negatividad del potencial de membrana (es decir que el potencial se aleje del cero), se dice que la célula se ha hiperpolarizado.

La membrana genera respuestas pasivas a flujos de corriente, denominados potenciales electrotonicos, que son responsables de despolarizaciones de pequeño tamaño y de la hiperpolarización de la membrana.

Dependiendo de la intensidad de despolarización se producirá el potencial de acción, que es una respuesta electrotonica, de característica "todo o nada" que se genera cuando la despolarización alcanza un valor umbral de aproximadamente +15 mV. ⁶

Como se ha indicado anteriormente la concentración de iones en el espacio intra y extracelular es variable. Las neuronas son permeables principalmente a los iones sodio (Na⁺), potasio (K⁺) y al cloro (Cl⁻) y en menor medida al calcio (Ca⁺⁺).

Los iones difunden a través de estructuras especializadas, de naturaleza proteica, dispuestas específicamente en todo el espesor de la membrana, los denominados poros o canales iónicos⁶, estos reconocen y seleccionan un ión concreto, para el que se abren o cierran, de acuerdo al tipo de señal que reciben (eléctricas, mecánicas o químicas).⁷

Los canales iónicos pueden ser pasivos (permanecen abiertos; no regulables) o activos (regulables). Los iones sodio y cloro se encuentran en mayor concentración en el espacio extracelular y el potasio junto con los aniones orgánicos en el espacio intracelular lo que confiere una distribución desigual de los mismos.

El flujo de los diferentes iones a través de la membrana, se produce gracias a dos fuerzas; el gradiente eléctrico que está determinado por su carga (conducción eléctrica) y el gradiente de concentración (conducción química). La relación entre estas dos fuerzas está descrita por la ecuación de Nerst².

El potencial de Nerst o potencial de equilibrio para un ión es el potencial de membrana en el que el flujo neto de ese ión a través de la membrana es cero y representa el punto en el que la conducción química y eléctrica están equilibradas⁴.

Los gradientes iónicos se pueden mantener sin gasto energético si coincide el potencial de membrana y el potencial de equilibrio para un ión, esto es típico en las células gliales, que son permeables selectivamente sólo al ión K⁺.

Por el contrario en las células que son permeables a distintos iones (K⁺, Na⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺), como es el caso de la neurona el potencial de membrana viene

dado por la ecuación de Goldman, este dependerá del número de canales que se encuentre abierto²⁻⁴.

Cuanto mayor es la concentración de un ión y cuanto mayor es la permeabilidad de la membrana para ese ión, mayor será su contribución al potencial de membrana⁹. Los gradientes iónicos en su mayor parte están mediados por mecanismos que consumen energía (obtenida por la hidrólisis del ATP), como la bomba sodio-potasio, que extrae sodio intracelular e introduce potasio extracelular, movilizándolo en contra de su gradiente electroquímico¹⁰.

1.2. PROPIEDADES ELÉCTRICAS ACTIVAS Y PASIVAS DE LAS NEURONAS.

La neurona posee tres propiedades fundamentales que utiliza como herramienta para llevar a cabo la generación de señales, estas son; los canales iónicos, los gradientes de concentración iónica y la capacidad de almacenar cargas eléctricas. Estas se pueden representar en un circuito eléctrico simple llamado circuito equivalente, que permite una mayor comprensión de la generación de las señales neurales y proporciona las bases para el entendimiento de los métodos de aplicación clínica en el estudio de la función neural².

Como se ha descrito anteriormente, la membrana celular actúa como condensador, es decir es capaz de almacenar cargas de distinto signo a cada lado de su superficie, la denominada capacitancia.

Cada canal iónico actúa como un conductor y una batería. La facilidad con la que un ión atraviesa la membrana a través de un canal iónico se denomina

conductancia, que se expresa como resistencia, (en el circuito eléctrico) debido a que la membrana celular es semipermeable.⁵⁻¹¹.

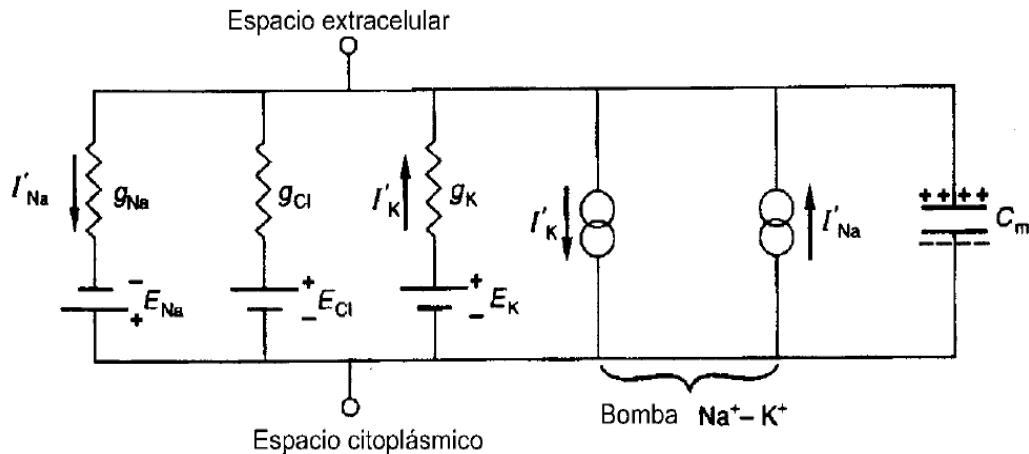


Figura 1. Circuito equivalente de la neurona, en el que se representan las baterías iónicas y sus conductancias (g), las corrientes pasivas de los iones Na^+ y K^+ (I) y la diferencia de potencial que generan (E), la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ como un generador de corriente y la membrana celular como su capacitancia (C_m). Tomado de Cardinali DP. Generación y conducción de potenciales en el sistema nervioso. Manual de Neurofisiología. 1992.

La bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ representa el generador de corriente.

En los extremos del circuito se encuentran el citoplasma y el líquido extracelular que actúan como conductores.

Las propiedades eléctricas que no se modifican durante la generación de señales se les denominan propiedades eléctricas pasivas y son:

- Conductancia (o su inversa resistencia) de los canales iónicos pasivos.
- Fuerza electromotriz, generada por la distribución desigual de cargas eléctricas a uno y otro lado de la membrana.
- Capacitancia de la membrana neuronal, correspondiente al área no conductiva.

Las propiedades eléctricas activas de la membrana, son las que cambian durante la generación de señales eléctricas, lo que implica cambios en la conductancia ⁵⁻⁸ de los canales activos regulados por voltaje y canales iónicos regulados por cambios físicos (deformación mecánica, compresión, etc)

1.3. POTENCIAL DE ACCIÓN

Para que la transmisión y conducción de señales en el sistema nervioso sea efectiva, se requiere de un proceso activo, es decir con consumo energía, ya que de forma pasiva, se necesitarían potenciales de gran intensidad para lograr que una señal llegara a la parte más distal del axón y que a su vez lograra provocar una respuesta funcional. El proceso activo de transferencia de cargas se conoce con el nombre de Potencial de acción.

El potencial de acción se debe a cambios rápidos del potencial de membrana. Cada potencial de acción comienza por un cambio brusco que va desde el potencial negativo normal del estado de reposo, hasta un potencial de membrana positivo, terminando con otro cambio de igual manera rápido hasta alcanzar un potencial negativo.

El flujo de corriente iónica a través de los canales de Na⁺ y K⁺ regulados por voltaje, es el responsable de la generación del potencial de acción a nivel axonal ¹¹.

El potencial de acción posee la extraordinaria capacidad de no atenuarse cuando se desplaza en distancia, lejos de su lugar de origen ¹² esta es la propiedad fundamental del impulso nervioso ⁶.

Para que la neurona genere el potencial de acción es necesario alcanzar el umbral. El umbral es el valor específico de despolarización en el que la

corriente iónica neta, (Na^+ y K^+) por los canales voltaje-dependientes y la de los canales de reposo, cambia su dirección de fuera a dentro, depositando cargas positivas en el interior de la membrana, cuando esto ocurre se comporta en forma del fenómeno todo o nada como se ha descrito anteriormente. En todos los casos el potencial alcanzado será independiente de la intensidad de los estímulos que se sumen para llegar al umbral.

La secuencia de sucesos en la generación del potencial de acción fue descrita por Hodgkin-Huxley: ⁶

- Despolarización de la membrana.
- Aumento de la conductancia de sodio con apertura de los canales voltaje-dependientes para este ión.
- Corriente interior de sodio.
- Descarga de la capacitancia de la membrana.
- Aumento de la despolarización, con mayor apertura de los canales de sodio.
- Aumento de la corriente interior de sodio.
- Sobrepaso del umbral y producción del potencial de acción.
- Estado de despolarización.
- Inactivación de los canales de sodio, se detiene el paso de este ión.
- Aumento de la conductancia del potasio, con la apertura de sus canales.
- Corriente de potasio hacia el exterior de la célula.
- Repolarización de la membrana.

Posterior al potencial de acción, la membrana recupera su valor de reposo, permaneciendo cerrados los canales de Na⁺ y abiertos los canales de K⁺. Esto hace que momentáneamente los canales de sodio estén inactivos¹².

El tiempo que requieren en cerrarse los canales de K⁺, se le denomina postpotencial, que es una fase de hiperpolarización transitoria, donde por milésimas de segundo la membrana se encuentra en estado de refractariedad es decir de disminución de la excitabilidad.

La fase de hiperpolarización se divide en dos partes; un periodo refractario absoluto, donde ningún estímulo es capaz de excitar la célula y otro relativo donde sólo los estímulos intensos pueden conseguirlo⁴.

2. ESTUDIOS NEUROFISIOLÓGICOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

2.1. REVISIÓN HISTÓRICA

Luigi Galvani (1737-1798) ha sido considerado como el iniciador de la Neurofisiología y de la Física, con sus experimentos nace la era de la electroneurología, que tanto a nivel terapéutico como diagnóstico se mantuvo hasta la primera década del siglo XX.

Galvani utilizó electricidad para estimular los nervios, demostrando que la actividad del sistema nervioso puede inducirse por medio de esta energía física.

Así mismo dedujo que el cuerpo humano tiene la propiedad de ser conductor de la electricidad y comprobó que al estimular un nervio con un impulso

eléctrico se generaba contracción de la musculatura, sin aplicar energía sobre dicho músculo. Es decir fue el primero en afirmar que el nervio por si solo tiene la capacidad de generar una descarga eléctrica.

Galvani afirmó “La electricidad animal se forma en el cerebro y a través de los nervios se transmite a todo el organismo y a los músculos”¹³.

En 1850 Hermann von Helmholtz registró por primera vez el potencial de acción generado en un nervio y su respuesta mecánica en un músculo, logrando llegar a medir la velocidad de conducción del potencial de acción¹⁴.

Helmholtz logró determinar que la velocidad de conducción nerviosa era de entre 25 y 43 m/s, resultado que obtuvo con un aparato construido por el mismo y que curiosamente (a pesar de su rudimentario instrumento), obtuvo mediciones extraordinariamente cercanas a las que se han establecido actualmente.

Adicionalmente en un estudio posterior enmarca la importancia que tiene la temperatura en los nervios que se van a estimular, mencionando que las velocidades de conducción más baja las ha obtenido cuando los nervios estaban a menor temperatura. Este hecho sigue estando vigente y se tiene muy en cuenta en los estudios neurofisiológicos de hoy.

Pero no fue hasta el experimento animal de Berry et al en 1948¹⁵, y posteriormente el realizado en humanos por Hodes et al en 1949¹⁶, que la técnica gano gran acogida y se popularizó como una prueba clínica. Eichler logró registrar los potenciales nerviosos percutáneamente desde nervios mixtos en el hombre¹⁷. Dawson y Scott¹⁸ fueron quienes desarrollaron una

técnica fiable de determinación de la conducción nerviosa del nervio mixto. Dawson también registro potenciales de acción sensitivos puros a través de electrodos de superficie colocados sobre el nervio, estimulando los nervios digitales.

En 1948, Hodes R. et al describieron por primera vez los estudios de conducción motora con aplicación clínica ¹⁹, con la mejora de la técnica y la realización de estudios posteriores se logró establecer parámetros de los valores normales²⁰⁻²¹.

Con esta base se comienza a describir los estudios de neuroconducción motora en diversos procesos patológicos.

En la segunda mitad del siglo XX se dieron grandes avances en los estudios de conducción nerviosa, los cuales han hecho contribuciones importantes al conocimiento de la función y fisiopatología del nervio periférico.

Así también se ha producido una mejora y perfeccionamiento de la tecnología de los aparatos y de los mecanismos de almacenamiento / análisis de la información, con el advenimiento de la informática, permitiendo de esta manera que la obtención de registros de conducción nerviosa sean a día de hoy una prueba sencilla y fiable para la valoración de la función del nervio periférico.

2.2. ESTUDIOS DE CONDUCCIÓN NERVIOSA (ECN)

El término Electroneurografía (ENG) se emplea para definir globalmente los ECN, clásicamente conocidos como estudios de estímulo-detección.

La ENG consiste en el estudio de la conducción de las fibras nerviosas motoras y/o sensitivas, evaluándose básicamente la integridad y la función de los nervios periféricos del organismo. En el examen se realiza el registro del potencial eléctrico generado en el músculo (en los estudios de conducción motora) o en el propio nervio (en los estudios de conducción sensitiva) al estimular uno o más puntos de la fibra nerviosa a través de la piel. La información generada permite evaluar parámetros como la velocidad de conducción nerviosa, la latencia o la morfología y la amplitud del potencial evocado motor (PEM) o sensitivo ²².

El ECN es un método eficaz que permite medir la capacidad de los nervios para conducir las señales eléctricas²⁷. Es una prueba muy sensible a los cambios patológicos que suceden en los axones, nodos de Ranvier y vainas de mielina. Es muy útil en resolución de dudas diagnósticas y en el estudio fisiopatológico del sistema nervioso periférico ²³.

La velocidad de conducción nerviosa (VCN), mide la rapidez a la cual un impulso es conducido a través de un nervio motor, sensitivo o mixto ³. Así pues los ECN pueden ser de tres tipos; conducción motora, conducción sensitiva o conducción mixta, de acuerdo al tipo de nervio que se desea estudiar.

Independientemente del tipo de estudio, el principio técnico es el mismo para todos: la estimulación eléctrica del nervio en uno o varios puntos, y el registro de la respuesta evocada, ya sea en el músculo dependiente de ese nervio, en el caso de estudio de conducción motora, o en el propio nervio, en los estudios de conducción sensitiva y mixta.

La estimulación se realiza con dos electrodos, se le denomina estimulación bipolar. Uno de los electrodos será activo (cátodo), es decir donde migran las cargas negativas, y el otro será el referencial (ánodo), donde migran las cargas positivas²⁴. En consecuencia se genera una corriente que despolariza el nervio a través del cátodo y lo hiperpolariza con el ánodo.

Los canales de sodio voltaje dependientes que se encuentran en la membrana plasmática de la fibra nerviosa, se abren, gracias al estímulo eléctrico, permitiendo la entrada de sodio al espacio intracelular y generando así una despolarización local de la membrana, que si alcanza su nivel umbral, genera un potencial de acción, que se propagará a lo largo del nervio.

Para evitar el bloqueo nodal en la conducción del impulso, es indispensable en el momento de estimular, que el electrodo activo del estimulador, siempre este dispuesto hacia el electrodo activo de recepción²³.

Para estimular un nervio, se utilizan siempre ondas cuadradas, es decir que tienen un inicio y un final brusco, y suele ser suficiente, con impulsos de 0.1 ms, y una intensidad de de 5 a 40 mA²⁴.

Para recoger la respuesta evocada, se utilizan electrodos de superficie o de aguja, posteriormente la señal pasa al electromiógrafo donde es filtrada y amplificada.

2.3. ESTUDIO DE CONDUCCIÓN NERVIOSA MOTORA (ECNM)

Con este tipo de estudio neurofisiológico se estudia y analiza la segunda motoneurona, la cual se localiza en el asta anterior de la médula espinal y

comprende la vía hasta el músculo esquelético. Para ello se estimula un nervio motor o uno mixto con pulsos eléctricos de intensidad supramaximal en dos puntos distintos a lo largo de su trayecto y se registra las respuestas eléctricas evocadas en un músculo dependiente de su inervación, son los denominados PEM o potencial de acción muscular compuesto (PAMC) ²².

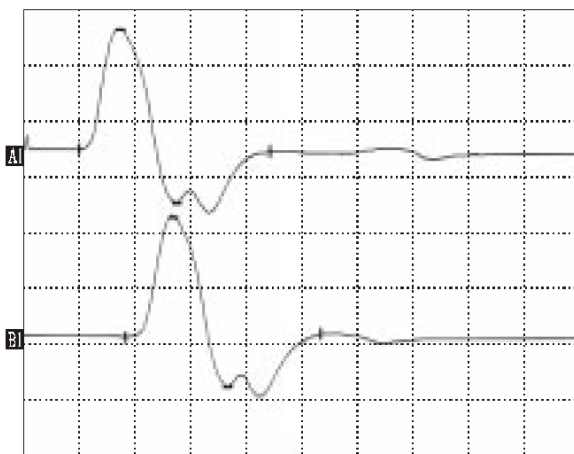


FIGURA 2. PAMC registrados en el músculo abductor del pulgar, tras estimulación supramáxima sobre dos puntos del nervio mediano.

Tomado de Santos C. Electroneurografía. El ABC de la Electroneuromiografía Clínica. 2003.

Los PAMC son la representación gráfica de la sumación temporal y espacial de todos los potenciales de acción generados por la estimulación eléctrica del nervio motor, los cuales se han producido en cada una de las fibras musculares de las diversas unidades motoras que alcanza el impulso eléctrico

La evaluación del nervio motor se realiza de manera indirecta, ya que no es posible obtener un potencial de acción motor directo. Por lo tanto como ya se

mencionó anteriormente se registra la respuesta motora a nivel del músculo que depende del nervio objeto de estudio. Esta diferencia con respecto a los estudios de conducción nerviosa sensitiva, ofrece la ventaja de magnificación de la respuesta ²²⁻²³.

Los axones que componen el nervio estimulado, provocan la activación de todas las fibras musculares que conforman su unidad motora, generando una respuesta, que se mide en milivoltios (mV). Esto provoca a su vez una desventaja importante, cual es que una respuesta anómala del PAMC puede estar causada además de por el nervio, por la placa neuromuscular o por el propio músculo, lo que podría llevar a interpretaciones erróneas ²⁴.

2.4. ASPECTOS TÉCNICOS DEL ECNM.

Es primordial que la técnica a emplear se estandarice para obtener resultados fiables y reproducibles.

Es recomendable que cada laboratorio de Neurofisiología cuente con su propia tabla de valores normales, aunque esto no es posible en muchos lugares, en contraposición se utilizan tablas estandarizadas.

La temperatura del miembro a estudiar, cobra especial importancia, ya que una temperatura baja, altera considerablemente los resultados; la latencia distal se prolonga, la velocidad de conducción nerviosa (VCN) disminuye y la amplitud y duración del PAMC aumenta ²⁵. Por esta razón, antes de iniciar la prueba es importante tomar la temperatura de dicho miembro y si se corrobora que es baja, se debe calentar a través de medios físicos.

2.5. ESTIMULACIÓN Y REGISTRO

Para llevar a cabo la estimulación, se utilizan electrodos de superficie o de aguja, sobre la piel limpia, siguiendo el trayecto anatómico del nervio, en los lugares donde el nervio sea más accesible y superficial.

En los estudios de conducción motora, el nervio se estimula en dos puntos a lo largo de su trayecto. La estimulación es catódica, es decir el cátodo actúa como electrodo activo, y siempre se debe colocar dirigido al electrodo activo de recepción (catódico o negativo) ²³.

Debe haber una distancia entre ánodo y cátodo de 2 a 3 cm, una distancia menor, disminuye la amplitud del PAMC. El cátodo produce una despolarización debajo de su superficie lo que conlleva un potencial de acción nervioso, mientras que la hiperpolarización bajo el ánodo tiende a bloquear la propagación del impulso nervioso ²⁴. El uso de una intensidad del 20 al 30 % supramaximal garantiza la activación de todos los axones nerviosos que inervan el músculo registrado.

El registro de los PAMC requiere un par de electrodos de superficie, localizados según la técnica vientre-tendón²³; uno activo colocado sobre el vientre del músculo y otro el indiferente colocado sobre el tendón. Con esta técnica, el potencial de acción muscular que se propaga, se genera en el electrodo activo, que se encuentra ubicado cerca del punto motor, dando lugar a una onda bifásica con negatividad inicial (deflexión del trazado hacia arriba, de acuerdo con la convención de la electrofisiología clínica).

Para minimizar el artefacto eléctrico y el riesgo teórico de electrocución²⁶ se debe utilizar un tercer electrodo, que sirva de tierra o masa, este debe estar localizado entre los electrodos de estimulación y registro.

Sobre los electrodos de estimulación y recepción se debe poner un gel conductor o agua saturada de sal, esto ayuda a disminuir la impedancia.

Para estimular el nervio, se debe ir incrementando la intensidad del estímulo paulatinamente, hasta obtener una respuesta de amplitud máxima, una vez se obtenga, se aumentará un 20 % más la intensidad, esto garantiza la obtención de una respuesta supramáxima²⁻³.

El PEM resultante de la estimulación debe dibujar trazado inicial negativo, aunque es posible que aparezca un potencial positivo antes del potencial negativo, esto ocurre debido a una mala colocación de los electrodos, es necesario pues cambiarles de posición hasta que desaparezca.

2.6. VALORACIÓN DEL ECNM

Usualmente se mide la latencia, amplitud, duración del PEM Y VCNM.

2.6.1. LATENCIA

La latencia motora se refiere al tiempo que transcurre desde el inicio del estímulo hasta el inicio de la respuesta del potencial evocado motor²³. Consta de dos componentes, el primero es el tiempo de conducción nervioso desde el

punto del estímulo, hasta el nervio terminal y el segundo el tiempo transcurrido desde el axón terminal hasta la placa motora.

La latencia motora distal se halla midiendo el espacio de tiempo entre el estímulo nervioso en el punto de estimulación más distal y el inicio del potencial evocado motor.

La latencia motora proximal se consigue estimulando el punto más alejado del músculo de recepción, esta es la que se utiliza para hallar la velocidad de conducción del nervio a través de dos puntos de estimulación.

2.6.2. AMPLITUD

La amplitud mide la altura de la respuesta evocada en mV. Aporta información sobre el número de unidades motoras que se despolarizan por el estímulo eléctrico aplicado al nervio periférico²⁻³.

Puede ser medida de dos formas: pico-pico; es decir, desde el valor negativo máximo al valor positivo máximo, o bien base-pico; desde la línea de base isoelectrica hasta el valor negativo máximo.

En la práctica clínica, es un parámetro que cobra especial importancia en la valoración del potencial evocado motor, debido a que es el único que se correlaciona directamente con los síntomas clínicos de debilidad. De la amplitud del potencial depende el resto del estudio, ya que si la amplitud es cero, es decir no se registra potencial, las mediciones posteriores no se puede llevar a cabo.

2.6.3. DURACIÓN

Es el tiempo transcurrido desde el comienzo hasta el final del potencial ²³. Este parámetro habla de la variabilidad de fibras, tanto fibras rápidas como lentas, que componen el nervio. Si la duración del potencial es larga indica que hay una gran diferencia entre la velocidad de conducción de los axones más rápidos comparado con los más lentos y viceversa.

2.6.4. VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN MOTORA (VCM)

La VCNM se define por la fórmula:

$$\text{VCM (m/s)} = \frac{\text{D (mm)}}{\text{Lp - Ld (ms)}}$$

D = distancia, Lp = latencia en el punto proximal, Ld = latencia en el punto distal.

De esta fórmula se deduce que es necesario estimular en dos puntos distintos del nervio para poder medir adecuadamente la VCNM, con esta medida se elimina el tiempo de la transmisión neuromuscular y el de generación del potencial de acción muscular ³.

La distancia, será la longitud comprendida entre el cátodo del estimulador y el cátodo del receptor, teniendo en cuenta el trayecto anatómico del nervio.

La VCNM que se obtiene será la de las fibras más rápidas, es decir las mielínicas de calibre grueso. Para obtener la VCNM en fibras más lentas, se requiere de técnicas de estimulación pareadas².

2.7. ECN: USOS Y LIMITACIONES

Los estudios neurofisiológicos juegan un papel importante en la delimitación de la extensión y distribución de una lesión y proporcionan una distinción global entre una afectación axonal y desmielinizante²⁸.

Esta división facilita un método sencillo y práctico para correlacionar las anomalías de la conducción con los principales cambios patológicos en las fibras nerviosas. Se ha demostrado en estudios in vitro que existen relaciones estrechas entre los hallazgos fisiológicos e histológicos que fundamentan esta técnica²⁹.

Adicionalmente el patrón de las anomalías de la conducción nerviosa puede caracterizar frecuentemente la naturaleza general de la alteración clínica.

De este modo el estudio de la conducción nerviosa permite evaluar:

- Si existe lesión en el sistema nervioso periférico.
- Si la lesión se ha producido en el nervio, en el músculo o en la unión neuromuscular.
- A que nivel del sistema nervioso se ha producido la lesión, y si es focal, segmentaria o localizada.
- Identifica la intensidad de la lesión.

- Define el carácter fisiopatológico fundamental de la lesión, si es axonal o desmielinizante.
- Identifica trastornos subclínicos, focales (por ejemplo túnel del carpo) como generalizados (por ejemplo Neuropatía sensitivo-motora hereditaria tipo I).
- Puede ayudar a orientar el pronóstico y la respuesta al tratamiento²⁻³⁻²³.

Lastimosamente, este tipo de prueba neurofisiológica presenta limitaciones; ya que depende de múltiples factores; tanto técnicos como del sujeto a estudiar, de esta manera encontramos que:

- No es posible valorar las fibras mielínicas de conducción lenta ni tampoco fibras amielínicas.
- Únicamente es posible estudiar los nervios que son accesibles anatómicamente.
- En ocasiones resulta complejo diferenciar una axonopatía de una neuronopatía
- Es una técnica incómoda para el paciente.

A pesar de sus limitaciones estos métodos pueden proporcionar información precisa para llegar al diagnóstico pertinente, si se usan de manera juiciosa y sobre todo en contextos clínicos fundamentados²³⁻²⁹.

3. ESTUDIO ELECTRODIAGNÓSTICO NO INVASIVO APLICADO A LA INVESTIGACIÓN COMPARADO CON EL ANÁLISIS DE LA HUELLA (FOOT-PRINT ANALYSIS)

Las lesiones de nervios periféricos son un problema común encontrado en la práctica clínica, que dependiendo de su gravedad pueden dar lugar a largo plazo a déficits funcionales en los pacientes, tales como; pérdida de la función motora, sensorial y autonómica.

Al tener unas repercusiones tan importantes, se han desarrollado numerosas investigaciones dirigidas a mejorar los métodos de la regeneración subsiguiente al daño nervioso.

El modelo más ampliamente utilizado para el estudio y análisis de la regeneración nerviosa, es la lesión del nervio ciático en la rata. Este al ser tan aceptado es un modelo muy extendido y por ende bien estandarizado.

Se ha investigado el efecto de regeneración de distintas sustancias neutróficas, diversos tipos de implante de nervio, métodos de terapia física y rehabilitación, etc, donde se ha tenido múltiples inconvenientes en la cuantificación precisa de dicha regeneración, estableciéndose métodos como; el análisis de la huella (Foot-print analysis), el electrodiagnóstico, la histomorfometría, pruebas sensoriales, entre otras.

3.1. REGISTRO ELECTRODIAGNÓSTICO NO INVASIVO.

Las pruebas electrofisiológicas se utilizan comúnmente en la práctica clínica y pueden realizarse también en modelos animales para determinar la naturaleza de los trastornos nerviosos periféricos, su gravedad, y su evolución.

Los estudios neurofisiológicos percutáneos permiten una medición fiable de los parámetros de regeneración axonal, así como de la densidad de las fibras nerviosas y de su mielinización, con métodos mínimamente invasivos.

.

La técnica neurofisiológica más empleada en la evaluación de la regeneración nerviosa en modelos experimentales, es la CNM. Esta consiste en estimular el nervio en los sitios proximal y distal a la lesión con impulsos eléctricos de intensidad creciente hasta obtener una respuesta máxima, el PAMC se registra con electrodos colocados en los músculos inervados por el nervio en cuestión. El electrodo de registro activo se coloca por vía subcutánea en el vientre del músculo, y la referencia en la inserción (tendón) del músculo.

Para evaluar la recuperación del nervio, el examen electrofisiológico puede ser iniciado una semana después de la lesión, ya que los axones dañados mantienen su excitabilidad eléctrica hasta 4-5 días. A partir de entonces, las primeras respuestas registradas ofrecen una estimación de la llegada de los axones más rápidos a los nervios y músculos diana.

El tiempo de reinervación muscular es uno de los mejores indicadores de los niveles de recuperación alcanzado meses o años después. La reinervación ocurre siguiendo una distribución proximal-distal, reinervándose primero los

músculos más cercanos a la lesión y haciéndolo más tardíamente los más distantes a esta³⁰.

Por lo tanto la recuperación a nivel distal se retrasa y no alcanza los mismos niveles que en los músculos más proximales, probablemente debido al número insuficiente axones regenerados que llegan a las largas distancias y los efectos secundarios producidos por la denervación prolongada³⁰⁻³¹.

Durante el transcurso de la regeneración, la amplitud del PAMC es el parámetro más útil para evaluar el grado de denervación / reinervación de nervios y músculos.

La amplitud del PAMC es proporcional al número de axones motores regenerados, aunque su recuperación completa no quiere decir que todos los axones del nervio lesionado han regenerado con éxito, ya que esta puede estar influida por la reinervación colateral³².

La latencia de aparición de los potenciales y la VCN derivada de las fibras regeneradas reflejan el grado de mielinización y el tamaño de los axones. En los nervios regenerados la latencia es prolongado y la VCN permanece disminuida por mucho tiempo, aunque esta no muestra diferencias significativas con las VCN de grupos control.

3.2. RECUPERACIÓN MOTORA. ANÁLISIS DE LA HUELLA. (FOOTPRINT ANALYSIS).

Actualmente el método estándar para la medición de la recuperación funcional después de una lesión del nervio ciático de la rata es el índice de función ciático (SFI), establecido por DeMedi-naceli et al, en 1982³³.

El cálculo del SFI consiste en la medición de diversas relaciones entre los dedos y la planta de los patas de los miembros posteriores de la rata.

Estos datos se obtienen a partir de las huellas dejadas por las patas traseras de los animales que previamente han pisado una almohadilla impregnada en tinta, quedando impresas sobre el suelo de una pista estandarizada, al dejarles caminar libremente sobre esta³³.

Después de la lesión del nervio ciático, las ratas desarrollan patrones de pie característicos que pueden medirse y reproducirse con fiabilidad.

La fórmula se basa en el uso de puntos de referencia de la huella o de la postura de la pata para calcular un índice que refleja el grado de deterioro motor / regeneración.

A lo largo del periodo de recuperación, se realiza el análisis de la marcha, el cual vuelve a los parámetros de normalidad de la huella cuando se alcanza la recuperación completa del nervio³⁴.

II. OBJETIVOS

- Revisar el estado actual de la técnica electrofisiológica de conducción nerviosa motora y su registro.
- Valorar la aplicabilidad de dicha técnica en la investigación animal.
- Comparar la mencionada técnica con la técnica de análisis de la huella.
- Registrar la función motora del nervio ciático de la rata.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales y diseño experimental.

Se utilizó una rata Lewis adulta, hembra de aproximadamente 250 gramos de peso. Mantenido en condiciones estándar de temperatura, ciclo luz / oscuridad, con alimento ad libitum y agua.

La vivienda y el cuidado del animal siguen las directrices de la legislación española en materia de protección de los animales.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética.

El animal fue anestesiado para permitir las mediciones neurofisiológicas.

Procedimiento: La rata fue anestesiada con una mezcla de Ketamina (20%) y Xilacina (80%) de acuerdo con las tablas estandarizadas por peso, fue administrada por vía intraperitoneal.

Para medir los potenciales de acción muscular del nervio ciático se utilizó el Electromiógrafo Mystro MS25 (Figura 3), localizado en la Facultad de Medicina de Valladolid.

Tanto para aplicar el estímulo sobre el nervio, como para recoger las señales, se utilizaron electrodos de aguja 0.5" x 27 G (diámetro 0,4 mm, longitud 12 mm; Ambu[®], Neuroline Subdermical, Malasia).



FIGURA 3. Electromiógrafo Mystro MS25 (Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid).

Los electrodos fueron insertados percutáneamente como se ilustra en la fotografía (Figura 4). El electrodo de tierra se colocó por vía subcutánea en el cuello. Los dos electrodos de registro se insertaron en el tendón y el vientre del musculo gastrocnemio (técnica vientre-tendón).

Para la estimulación proximal, los dos electrodos de estimulación se colocaron cerca a la articulación de la cadera. En la estimulación distal, los electrodos se insertan en la fosa poplítea, aproximadamente 1 cm caudal a la articulación de la rodilla. En cada punto de estimulación se emitió un impulso rectangular con intensidad supramáxima, y los PAMC respectivos se registraron en la pantalla del Mystro.

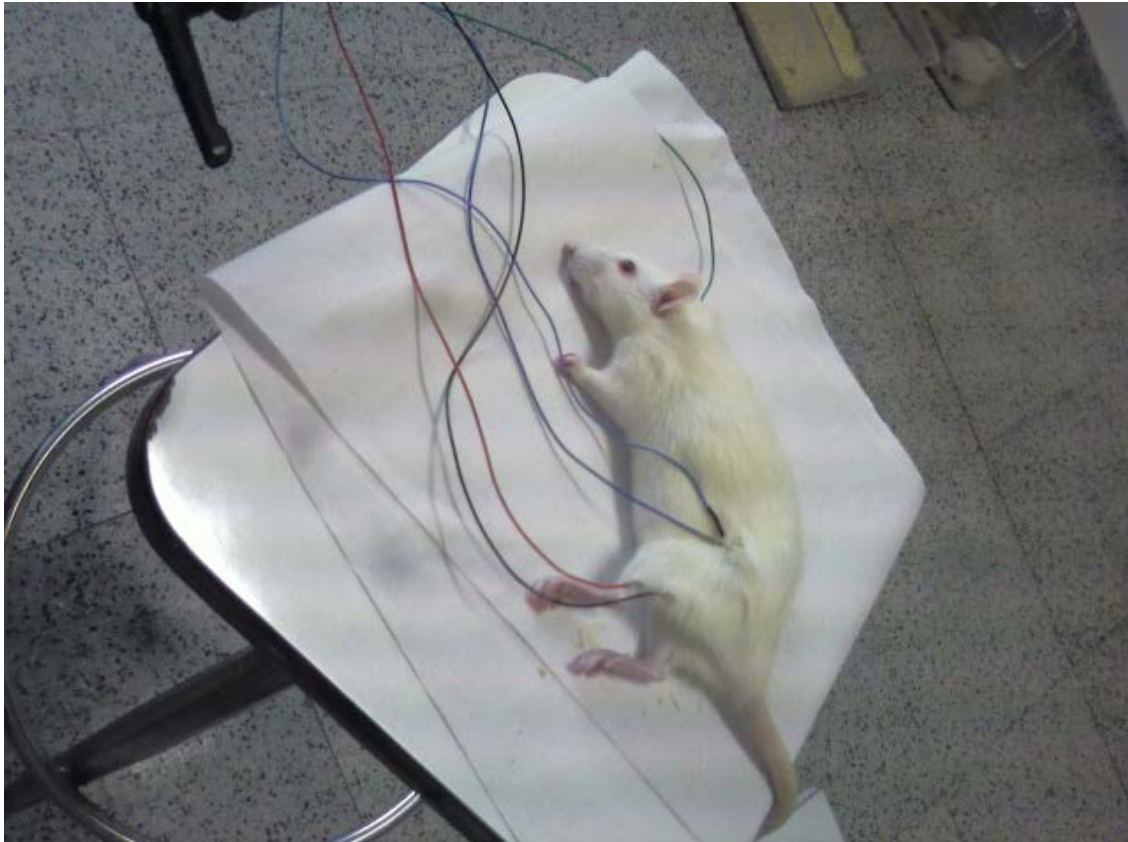


FIGURA 4. Posición de los electrodos de aguja para la estimulación y registro de los PAMC, en la pata trasera de la rata.

El electromiógrafo calculó automáticamente la VCNM basándose en la diferencia de latencias y la distancia (en milímetros) entre el punto de estimulación proximal y distal.

IV. RESULTADOS.

Se obtuvieron los PAMC del nervio ciático en dos puntos de estimulación con sus respectivas latencias y se halló la VCNM en dicho trayecto.

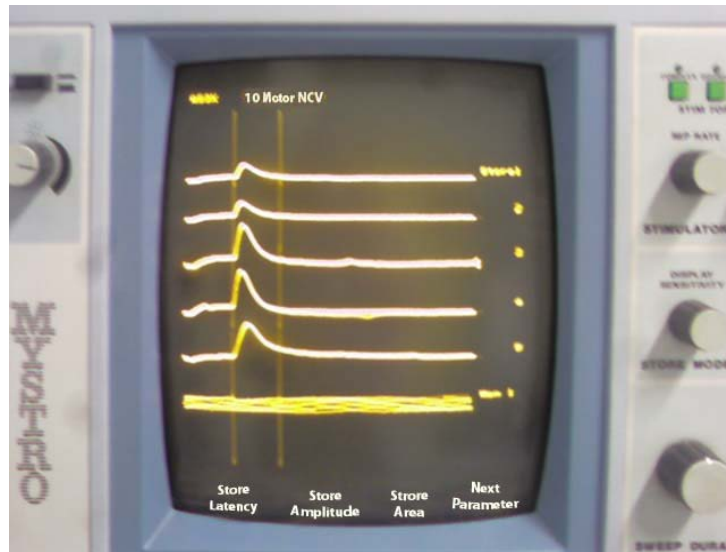


FIGURA 5. Respuestas obtenidas tras estimulaciones seriadas del nervio, incrementando paulatinamente la intensidad del estímulo hasta llegar al estímulo supramáximo.

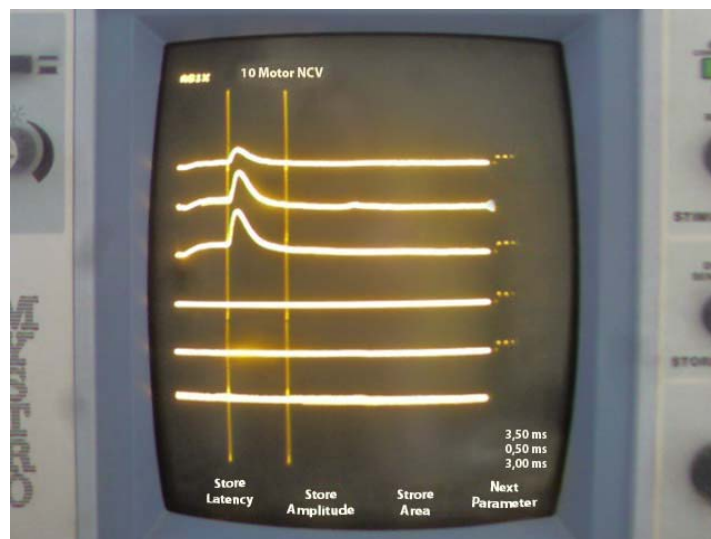


FIGURA 6. PAMC registrados en el músculo gastrocnemio de la pata trasera de la rata, tras estimulación eléctrica supramaximal del nervio ciático, sobre dos puntos de su trayecto. *Latencia proximal 3,00 ms. Latencia distal 3,50 ms.*

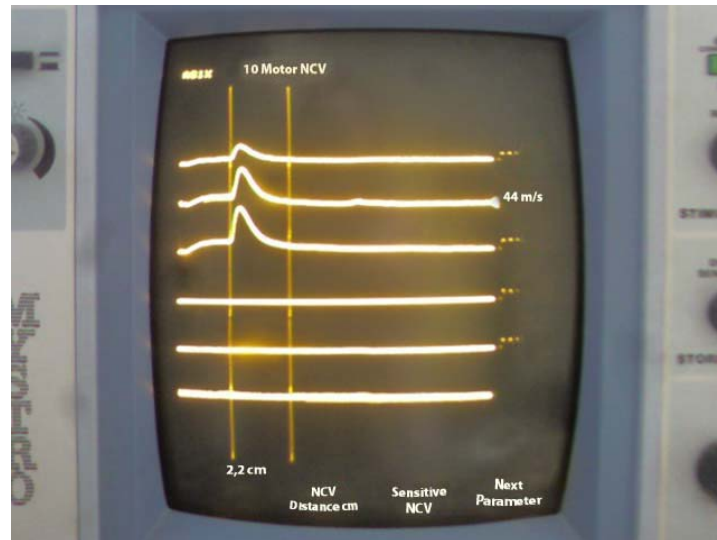


FIGURA 7. PAMC registrados en el músculo gastrocnemio de la pata trasera de la rata, tras estimulación eléctrica supramaximal del nervio ciático, sobre dos puntos de su trayecto.
VCN: 44 m/s.

Distancia (trayecto de nervio)= 22 mm

Latencia proximal: 3.00 ms.

Latencia distal:3.50 ms

$$\text{VCM (m/s)} = \frac{22 \text{ mm}}{3.5 - 3.0 \text{ (ms)}}$$

VCM= 44 m/s

La VCM normal en una rata³⁵ esta entre 40 y 120 m/s.

V. DISCUSIÓN.

El desarrollo de técnicas cada vez más sofisticadas de regeneración nerviosa a nivel experimental, ha creado la necesidad de instaurar métodos de evaluación que permitan medir de manera objetiva dicha regeneración.

Desde que fue expuesto por primera vez el análisis de la huella como técnica para evaluar la función total del miembro inferior, ha sido utilizada por muchos investigadores en el estudio de la recuperación de la función global del miembro inferior, después de provocar lesiones del nervio ciático³⁵.

El análisis de la huella es un estudio barato y requiere un equipo mínimo, por esta razón se emplea universalmente, pero lastimosamente posee algunas limitaciones derivadas de las complicaciones de la lesión del nervio³³.

Cuando se produce una lesión en el nervio ciático de la rata, a menudo surgen automutilaciones, contracturas de las masas musculares y de los dedos de la pata trasera del animal. Estos hechos hacen que se pierdan rasgos anatómicos del pie que repercuten en la marcha, indispensables para que pueda ser aplicado el análisis de la huella, lo que conlleva a excluir numerosos ejemplares de los estudios³⁶.

Adicionalmente, este tipo de técnica sólo proporciona resultados en las últimas fases de regeneración nerviosa y no puede ser utilizado para analizar el proceso de reinervación funcional temprana de los músculos de las extremidades inferiores, que son de gran interés en la detección oportuna de diferencias entre las diversas técnicas de ingeniería de tejido nervioso³⁴.

En contraposición los estudios neurofisiológicos tienen la ventaja de no verse afectados por la automutilación, o contracturas musculares del animal.

El electrodiagnóstico mínimamente invasivo tiene la ventaja de permitir la evaluación periódica de reinervación a intervalos de tiempo predefinidos sin sacrificar los animales o interferir con el progreso de regeneración³³.

Así también proporciona información objetiva sobre el número de axones motores regenerados, el grado de denervación / reinervación de nervios y músculos, el grado de mielinización y el tamaño de los axones.

Es importante señalar también que los estudios neurofisiológicos se pueden utilizar pasados 4 a 5 días después de la lesión del nervio, lo que proporciona una valoración del estado de recuperación nerviosa temprano, siendo este de gran importancia en la cuantificación de los pequeños cambios producidos al inicio de la recuperación nerviosa³⁵.

En nuestro experimento obtuvimos un registro del nervio ciático de la rata, recogido en el músculo gastrocnemio, con el electromiógrafo Mystro MS25, que

presento las características del PAMC de un nervio motor de onda inicial negativa con repolarización posterior.

Estos resultados avalan el empleo de la técnica de registro electromiográfico en la experimentación animal con roedores.

VI. CONCLUSIONES

1. Los estudios neurofisiológicos son una herramienta indispensable en la práctica clínica diaria, proporcionando información útil en la solución de dudas diagnósticas, así como en el seguimiento evolutivo y la respuesta al tratamiento de diversas afecciones del sistema nervioso periférico y su posible pronóstico.
2. El uso de métodos Neurofisiológicos permite una estrecha vigilancia del progreso de la recuperación motora, permitiendo una estimación fiable de los parámetros de regeneración axonal tales como la mielinización y densidad de la fibra nerviosa.
3. La mayor objetividad del registro neurofisiológico comparado con el análisis de la huella, lo hace ser un método más indicado para el estudio de la regeneración nerviosa.
4. El resultado de VCNM obtenido en la rata es equiparable a los datos ofrecidos en la literatura lo que hace presuponer que el procedimiento utilizado es correcto y el aparato empleado, a pesar de su antigüedad, esta en adecuadas condiciones de uso.

Bibliografía

1. Kothari MJ, Blakeslee MA, Reichwein R, Simmons Z, Logigian EL. Electrodiagnostic studies: are they useful in clinical practice? Arch Phys Med Rehabil 1998. 79(12):1510-1.
2. Kimura J. Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice. 2ª ed. Philadelphia: F. A. Davis company. 1989. 3-40.
3. Fernández Rodríguez JM. Electroneurografía. Estudios de conducción nerviosa. Tratado de Neurología. Madrid: ELA; 1994. 126-130.
4. Cardinali DP. Generación y conducción de potenciales en el sistema nervioso. Manual de Neurofisiología. Madrid: Ediciones Díaz de Santo S.A. 1992. 17-39.
5. Rutecki PA. Neuronal excitability: voltage-dependent currents and synaptic transmission. J Clin Neurophysiol. 1992. Apr;9(2):195-211.
6. Esteban A. Conceptos de electrofisiología celular. Manual del IV Curso de diagnóstico morfológico y fisiológico de las enfermedades neuromusculares; Madrid. 1999: 2-22.
7. Bruehl C, Wadman WJ, Witte OW. Concentration dependence of bicarbonate-induced calcium current modulation. J Neurophysiol 2000. 84(5): 2277-2283.
8. Clay JR, Kuzirian AM. Localization of voltage-gated K(+) channels in squid giant axons. J Neurobiol 2000. 45(3): 172-184.

9. Evans JR, Bielefeldt K. Regulation of sodium currents through oxidation and reduction of thiol residues. *Neuroscience*. 2000. 101(1): 229-236.
10. Bruehl C, Wadman WJ, Witte OW. Concentration dependence of bicarbonate-induced calcium current modulation. *J Neurophysiol* 2000. 84(5): 2277-2283.
11. Ong BH, Tomaselli GF, Balsew JR. A structural rearrangement in the sodium channel pore linked to slow inactivation and use dependence. *J Gen Physiol* 2000. 116(5): 653-662
12. Bostock H. Impulse propagation in experimental neuropathy. *Peripheral neuropathy, volumen I*. 3ª ed. Philadelphia: W. B.Saunders Company; 1993. 109-120.
13. Balcells M. La Neurología en la ilustración. Historia general de la Neurología. Barcelona. Sociedad Española de Neurología. 2009. 140-149.
14. Helmholtz,H: vorläufiger Bericht über die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Nervenreizung. *Arch Ant Physiol Wiss Med*. 1850. 71-73.
15. Berry, CM, Grundfest,H and Hinsey, JC: the electrical activity of regenerating nerves in the cat. *J Neurophysiol* 7. 1944.103-115
16. Hodes R, Larrabee Mg, German W. The human electromyogram in response to nerve stimulation and the conduction velocity of motor axons: studies on normal and on injured peripheral nerves. *Arch neurol Psychiatry*. 1948. 60;340-353.

17. Eichler, W: Über die Ableitung der Aktionspotentiale vom menschlichen Nerven In situ. Z Biolo 1937. 98:182-214.
18. Dawson, GC, And Scout, JW. The recording of nerve action potentials through swing in man. J neurol neurosurg Psychiatry 1949.12:2 59-267.
19. Hodes R, Larrabee Mg, German W. The human electromyogram in response to nerve stimulation and the conduction velocity of motor axons: studies on normal and on injured peripheral nerves. Arch neurol Psychiatry, 1948. 60:340.
20. Magladery JW, McDougal DB Jr. Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. Identification of certain reflexes in the electromyogram and the conduction velocity of peripheral nerve fibres. Bull Johns HopkinsHosp. 1950. 86:265.
21. Wagman IH, Lesse H. Maximum conduction velocities of motor fibers of ulnar nerve in human subjects of various ages and sizes. J Neurophysiol. 1951. 15:235.
22. Santos C. Electroneurografía. El ABC de la Electroneuromiografía Clínica. La Habana. EC Med. 2003. 99-127.
23. Gutiérrez-Rivas E, Jiménez MD, Pardo J, Romero M. Estudios de conducción nerviosa motora y sensitiva: hallazgos normales. Manual de electromiografía clínica. 2ª ed. Madrid. Ergon. 2008. 51-66.
24. Wilbourn AJ. Estudios de conducción nerviosa: tipos, componentes, alteraciones y valor de localización. Clínicas Neurológicas de Norteamérica. Electromiografía clínica, 2002. 295-330.

25. Bolton, CF, Sawa, GM, and Carter, K. The effects of temperature on human compound actions potentials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1981. 7:473-493.
26. Al-Shekhlee A, Shapiro BE, Preston DC. Iatrogenic complications and risks of nerve conduction studies and Needle electromyography. *Muscle Nerve*. 2003. 27: 517-526.
27. Oh, SJ. *Clinical electromyography. Nerve conduction studies*. Williams and Wilkins. 2^a ed. Baltimore. 1996.
28. Thomas PK. Morphological basis for alterations in nerve conduction in peripheral neuropathy. *Proc Roy Soc Med*. 1971. 64: 295-298.
29. Dyck, PJ, Jonson, WJ Lambert, EH, and O'Brien, PC. Segmental demyelination secondary to axonal degeneration in uremic neuropathy. *Mayo Clin Proc*. 1971. 46:400-432.
30. Krarup C. Nerve conduction studies in selected peripheral nerve disorders. Source Department of Clinical Neurophysiology, The Neuroscience Center, Rigshospitalet. 2003.16(1):115-20.
31. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst*. 2003. 8(4):236-50.
32. Brown MJ, Sumner AJ, Greene DA, Diamond SM, Asbury AK. Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. *Ann Neurol*. 1980. 8(2):168-178.
33. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982. 77(3):634-643.

34. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989. 83(1):129-38.
35. Korte N, Schenk HC, Grothe C, Tipold A, Haastert-Talini K. Evaluation of periodic electrodiagnostic measurements to monitor motor recovery after different peripheral nerve lesions in the rat. *Muscle & Nerve.* 2011. 44(1): 63-73
36. Penna V, Bjoern Stark G, Leibig N, Boyle V, Sakalidou M. Rho-inhibition by local application of c3-toxin for enhancement of axonal sprouting in a rat end-to-side nerve repair model. *Microsurgery.* 2012. 32(3): 207-12.