

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

GRADO EN MEDICINA



TRABAJO FIN DE GRADO  
CURSO 2017/2018

**EMPLEO DE LA ELECTRONEUROGRAFÍA  
PARA EL ESTUDIO IN VIVO DE LA FUNCIÓN  
MOTORA EN LA REGENERACIÓN  
MUSCULAR EN RATA.**

AUTOR: David Ramón Laguna Allende

TUTOR: Dr. Héctor J. Aguado Hernández

COTUTORA: Dra. Benedicta Catalán Bernardos

# Índice

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>RESUMEN</b>              | <b>3</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>         | <b>4</b>  |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> | <b>7</b>  |
| <b>RESULTADOS</b>           | <b>10</b> |
| <b>DISCUSIÓN</b>            | <b>13</b> |
| <b>CONCLUSIÓN</b>           | <b>16</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>         | <b>17</b> |
| <b>ANEXOS</b>               | <b>20</b> |

## **RESUMEN**

**Introducción:** La lesión muscular es una patología muy frecuente en la práctica clínica. La investigación de nuevas terapias para su tratamiento nace de la necesidad de encontrar un tratamiento eficaz para las roturas de gran tamaño. Para el estudio comparativo de los tratamientos se usa habitualmente la histología, pero tiene la desventaja de que no se puede reproducir ni se puede usar en humanos. Para superar estas desventajas se está intentando usar los estudios de electrodiagnóstico.

**Materiales y métodos:** se han utilizado 10 ratas a las cuales se les ha realizado un defecto muscular volumétrico en ambas patas, aleatorizándolas y rellenándolas con 4 geles: físicos y químicos con y sin células sembradas y un grupo control sin relleno. Se les ha estudiado con electroneurografía (ENG) antes del defecto, a las 4 semanas y a las 12 semanas. Se les ha estudiado varios parámetros, centrándose en la amplitud y la latencia, con los que se pretende ver el comportamiento de la regeneración reflejado a través de la ENG.

**Resultados:** en todos los casos se ha podido ver el efecto del defecto muscular con una bajada de la amplitud máxima y también el efecto de la regeneración muscular con su incremento a lo largo de las semanas. La latencia no se ha visto afectada ni por el defecto muscular ni por la regeneración.

**Conclusión:** se ha visto que la ENG refleja el comportamiento esperado, pudiendo servir en un futuro para no solo el estudio de la regeneración muscular en ratas sino también como herramienta de control de la regeneración en el humano.

**Palabras clave:** electroneurografía, electrodiagnóstico, amplitud, latencia, regeneración muscular.

## **INTRODUCCIÓN**

El músculo esquelético es un órgano que forma parte del sistema neuromuscular. Por su función, metabolismo y distribución (es el tejido más grande de nuestro cuerpo con hasta un 40% de la masa corporal total<sup>3</sup>) es susceptible a múltiples trastornos, desde traumatismos sufridos en accidentes de tráfico o laborales, a enfermedades musculares genéticas como la distrofia muscular<sup>1 20</sup>. El músculo, tras estas agresiones, tiene la capacidad de repararse y la gran mayoría de lesiones son leves y curan sin secuelas, pero un 3-10% son lesiones graves, lo que puede llegar a dejar una incapacidad absoluta para el deporte y la vida diaria <sup>2</sup>. Algunas de estas lesiones graves son defectos musculares volumétricos (Volumetric Muscle Loss, VML, en inglés) definido como una pérdida de al menos el 20% de su masa, resultando en un déficit funcional significativo <sup>16</sup>.

La regeneración del musculo esquelético es un proceso complejo por la implicación de múltiples pasos. La inflamación se ha visto que tiene un papel fundamental, ya sea comenzando la respuesta inicial al daño muscular como activando después el sistema de reparación <sup>3</sup>. El proceso de recuperación se compone de 3 fases: fase de destrucción, fase de reparación y fase de remodelación <sup>7 12</sup>.

Durante la fase de destrucción se produce una lesión en la membrana de la célula muscular con la salida del contenido celular y factores quimiotácticos <sup>3</sup>, lo que produce una necrosis e inflamación en la zona afectada <sup>4</sup>. Termina con el proceso de fagocitosis del tejido necrótico de la zona <sup>5 6</sup>. La fase de reparación inicia la regeneración de miofibras por la diferenciación de células satélite, la producción de una cicatriz de tejido conectivo mediante la migración de fibroblastos y el restablecimiento de la conexiones vasculares y nerviosas <sup>7 8</sup>. En la fase final de remodelación, el tejido regenerado madura y el tejido conectivo fibroso formado se reorganiza y se contrae <sup>9 10</sup>. Especialmente después de la pérdida severa de tejido, la matriz inicial requiere una remodelación extensa, y un proceso desequilibrado puede derivar en fibrosis persistente, lo que perjudica el proceso de regeneración muscular y la recuperación funcional completa<sup>11</sup>.

Durante el daño muscular también se dañan los nervios y vasos que inervan y nutren las células musculares. En el proceso de regeneración muscular es necesario que también se repare el paquete vasculonervioso <sup>8</sup>. Si no se produce la revascularización y la reinervación se puede producir una parada en el proceso de regeneración. Las miofibras pueden continuar la regeneración hasta la fase de miotubo, incluso en ausencia de inervación, pero se produce atrofia si no se logra la reinervación. En caso de denervación neurogénica (ruptura del axón), la reinervación requiere el rebrote de un nuevo axón distal a la ruptura. Debido a que los axones generalmente se rompen dentro o al lado del músculo, el contacto nervio-músculo se restablece con bastante rapidez <sup>13</sup>.

Debido a que las terapias actuales no parecen poder recuperar la capacidad total del músculo antes de la lesión <sup>15</sup>, aparece la ingeniería tisular. La ingeniería tisular está basada en nuevas terapias con células madre (Stem Cells) y/o biomateriales enfocadas a la formación de un microambiente que facilite una respuesta inflamatoria adecuada y la regeneración muscular óptima mediante la correcta interacción célula-célula y célula-matriz <sup>2 12</sup>.

Inicialmente en el estudio comparativo de los geles se nos plantean dos dificultades. La falta de un modelo animal seguro y fácilmente reproducible de VML <sup>2 25</sup> y que el estudio de la regeneración se suele realizar por análisis histológico por biopsia. Actualmente se usa a las ratas con un protocolo estandarizado como modelo de VLM <sup>25</sup>. Sin embargo, la biopsia “completa” del músculo regenerado no se puede realizar hasta el final del estudio porque sería un nuevo defecto y además no se puede realizar en caso de estudios humanos, por lo que sigue siendo un problema.

En este contexto aparecen los métodos electrofisiológicos no invasivos para el estudio funcional del músculo regenerado. La electroneurosiología en humanos es usada frecuentemente para localizar el sitio de la lesión a lo largo del nervio, determinar la gravedad de la lesión y diferenciar si un nervio lesionado todavía está degenerando o regenerando <sup>26</sup>, lo que permite un manejo más preciso de las alteraciones neurogénicas <sup>28</sup>, demostrándose un examen complementario muy útil en el examen clínico del sistema nervioso periférico <sup>18</sup>.

En investigación el análisis neurofisiológico ofrece múltiples ventajas respecto al análisis histológico: establece formas estandarizadas de describir los hallazgos; permite la reproducibilidad de los resultados ya que no requiere crear un nuevo defecto; garantiza la documentación numérica de los hallazgos; permite relacionar los resultados con valores de referencia; garantiza que los resultados estén disponibles para ulteriores evaluaciones y comparaciones puesto que no requiere sacrificar al animal <sup>20</sup>. Además, permite una forma de comprobar la evolución de las lesiones musculares en humanos donde la biopsia no es una opción.

En este trabajo nosotros nos centraremos en el estudio de la actividad eléctrica generada en las estructuras anatómicas del sistema nervioso periférico, es decir, la electroneurografía (ENG) o Estudio de Conducción Nerviosa (NCS de sus siglas en inglés: nerve conduction studies). Se ha elegido esta modalidad por varias razones: aunque en realidad la técnica explora directamente la función de las fibras nerviosas motoras, en esta interviene tanto la transmisión neuromuscular como la contracción de las fibras musculares, por lo que nos sirve para ver el estado del músculo; es más objetiva porque se controla la intensidad del estímulo que produce el nervio y reproduce las condiciones (repetimos la estimulación y obtenemos la misma respuesta), no depende de la colaboración del sujeto y no influyen la anestesia ni otras condiciones. La EMG en sentido estricto es el registro de la actividad eléctrica del músculo sin la estimulación del nervio, en reposo (no debe haber actividad en músculo sano) y con el esfuerzo (mínimo, mantenido y máximo), y esta es la razón de no usar la EMG en experimentos con animales, ya que no colaboran, y no se puede hacer en animales anestesiados.

Los principales valores que se van a usar en este estudio van a ser la amplitud y la latencia. Se han elegido estos parámetros ya que son los que se utilizan en la práctica médica, en humanos, para estudiar la función, comparar con las tablas de normalidad y decidir si esa exploración es patológica.

La amplitud es la altura máxima alcanzada por la respuesta evocada en mV. La amplitud se incrementa de manera directamente proporcional al área de fibras, cortadas transversalmente, de la unidad motora y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la distancia de las fibras al receptor/electrodo

de registro <sup>29</sup>, de manera que se relaciona con la movilización muscular. Un potencial de acción muscular de baja amplitud indicará pérdida de unidades motoras<sup>32</sup>, atrofia de fibras musculares, aumento del tejido conectivo y fallas o bloqueos de la transmisión neuromuscular <sup>20 27</sup>.

La latencia es la diferencia de tiempo entre la estimulación del nervio y la respuesta muscular. Es el parámetro utilizado para ver la rapidez de respuesta de las fibras. El tiempo de latencia está relacionado con la mielinización del nervio y con el diámetro de éste <sup>19</sup>. Además, da información acerca del tiempo necesario para excitar los axones en el sitio de estimulación hasta el punto de generar en ellos potenciales de acción; del tiempo que toma la transmisión neuromuscular y del tiempo preciso para que ocurra la transmisión intramuscular de la excitación <sup>20</sup>. Al producirse el defecto muscular también se produce un fallo en las fibras nerviosas que debe repararse.

El objetivo es analizar y describir mediante el empleo de la ENG la regeneración muscular, para ver si es útil en el seguimiento de las lesiones musculares en rata y si se podría usar en el ser humano.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se han empleado 10 ratas Wistar Han, a las que se ha creado un defecto en el músculo tibial anterior de ambas patas traseras, presentando una n total de 20 patas. El defecto muscular se ha rellenado con diferentes elastómeros para intentar conseguir la regeneración muscular. El grado de regeneración muscular se ha evaluado realizando ENG del músculo tibial anterior. En el transcurso del experimento murieron dos ratas por lo que en la última exploración sólo se pudieron estudiar 16 patas.

Todas las ratas fueran alojadas en el Animalario de la facultad de Medicina de Valladolid, en condiciones estándar de temperatura, ciclo luz/oscuridad, con alimento ad libitum y agua.

El cuidado de los animales sigue las normas de la legislación española en materia de protección de animales. El estudio fue aprobado por el Comité de

Ética en Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valladolid, y autorizado por la Junta de Castilla y León

### **Creación de defecto muscular y reparación**

Se realizó una incisión en la piel anterolateral en la pata izquierda y se expuso el músculo tibial anterior. La fascia se incidió longitudinalmente y se liberó cuidadosamente del vientre muscular. El vientre muscular se laceró transversalmente en la porción media con un bisturí [Anexo 1 Ilustración 3]. El defecto tenía forma de cuña, y su tamaño era aproximadamente de 6 mm de largo, 5 mm de ancho y 5 mm de profundidad. El defecto se reemplazó por una serie de matrices con/sin células stem suspendidas en diferentes geles, separando aleatoriamente las 20 patas en cuatro grupos:

- A.- Se le cierra el defecto con un gel químico con células plantadas
- B.- Se le implanta una matriz con gel químico
- C.- Se le implanta una matriz con gel físico con células plantadas
- D.- Se le implanta una matriz con gel físico
- E.- Se le cierra el defecto sin reparación.

### **Protocolo anestésico/analgésico/antibiótico.**

Durante el estudio el animal es anestesiado para permitir mediciones fisiológicas. Anestesia preoperatoria: Ketamina a dosis de 75 mg/kg, más Medetomidina a dosis de 0,5 mg/kg, todo en administración intraperitoneal. Analgesia postoperatoria: se administrará ibuprofeno en agua a dosis de 10 mL/L de agua hasta las 72 horas y analgesia en nocilla durante los tres días posteriores a la cirugía. El mismo protocolo anestésico se empleó para realizar la miografía. La monitorización de la profundidad anestésica se realizó mediante valoración visual de respuesta motora ante estímulos dolorosos.

### **Protocolo de eutanasia**

Inyección por vía intravenosa de pentobarbital a 100 mg/kg, comprobándose la muerte del animal por el cese de la función respiratoria, del latido cardíaco y por la pérdida de reflejos. Extracción de las muestras necesarias para posterior análisis histológico.



## Medición de potenciales basales

Se identificó a cada animal con un código insertado en un chip. Se realizó una primera exploración basal (antes de realizar el defecto) en cada pata. Se recogieron los datos identificando a cada animal y cada pata, izquierda y derecha antes de realizar el defecto muscular, a las 4 semanas y a las 12 semanas.

La medición de potenciales se realizó mediante Electroneurografía motora (ENGm). El protocolo utilizado fue estimular el N. Peroneal Común con dos electrodos de aguja subcutáneos puestos en la fosa poplítea de cada pata. Los electrodos que se han usado en el estudio son electrodos de aguja 0.5" x 27 G (diámetro 0,4 mm, longitud 12 mm; Ambu®, Neuroline Subdermical, Malasia). Se registra, a la vez, con dos electrodos de aguja intramusculares, la respuesta del músculo Tibial anterior. Se colocó un electrodo "de tierra" subcutáneo de aguja, entre el estimulador y el registro.



**Figura 1:** Posición de los electrodos de aguja para la estimulación y registro de los PAMC, en la pata trasera de la rata.

Se utilizó un equipo Synergy de dos canales con el software adecuado para poder registrar la "respuesta umbral" y la "respuesta máxima" en las siguientes condiciones: estímulo de 0'2 ms de duración, intensidad creciente en pasos de 0'02 mA, barrido o tiempo de análisis de 50 ms y una amplificación de 1mV/div.

Se empezó estimulando con intensidad creciente, en pasos de 0'02 mA hasta obtener una respuesta umbral, considerando umbral a la respuesta de amplitud igual o superior a 1 mV, para diferenciar de la contracción esporádica

que pudiese hacer la rata o de la actividad eléctrica de fondo. Se siguió aumentando la intensidad y registrando respuestas hasta conseguir la respuesta de amplitud máxima y latencia mínima. [Anexo 1 Ilustración 2]

Se repitió la exploración, siguiendo el mismo protocolo, a las cuatro semanas de la intervención y a las doce semanas de la intervención.

Se analizaron todas las exploraciones registradas elaborando una base de datos con las siguientes variables:

- Intensidad en mA con la que se consigue la respuesta umbral
- Latencia en ms de la respuesta umbral
- Amplitud en mV de la respuesta umbral (igual o superior a 1 mV)
- Intensidad en mA necesaria para conseguir la respuesta máxima
- Latencia en ms de la respuesta máxima
- Amplitud en mV de la respuesta máxima

En un primer análisis elegimos la amplitud en mV de la respuesta máxima como mejor indicador de recuperación funcional porque es el parámetro que tiene una correlación más directa con el número total de fibras musculares funcionantes que se contraen al recibir el impulso eléctrico de las fibras motoras del nervio estimulado y la latencia en ms de la respuesta umbral, como parámetro para ver el estado de la fibra nerviosa y la unión neuromuscular. En el Anexo 1 tabla 6, podemos ver los valores de todos los parámetros recogidos durante el estudio.

## **RESULTADOS**

### **Amplitud**

En la Tabla 1 podemos ver la evolución de la amplitud en mV a lo largo del tiempo. La media de esta amplitud en las respuestas basales, en el músculo intacto antes del defecto, fue de 33.01 mV con una desviación estándar de 9.82 mV; a las 4 semanas del defecto la media fue de 20.05 mV con una desviación

estándar de 6.49 mV. Y a las 12 semanas del defecto la media de amplitud de la respuesta máxima fue de 25.11 mV con una desviación estándar de 7,61 mV.

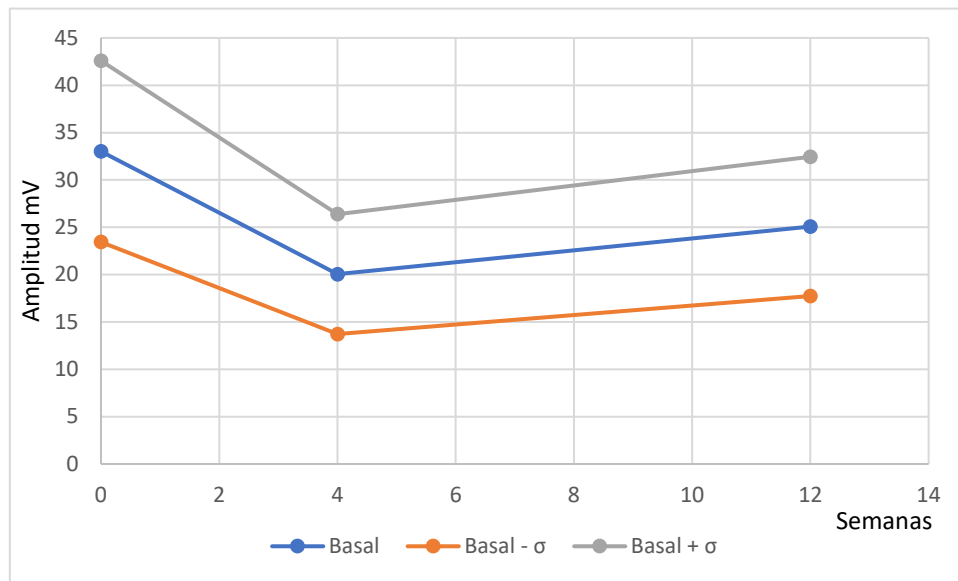


Tabla 1: Evolución de la media de la amplitud máxima alcanzada de manera basal, a las 4 semanas y a las 12 semanas.

Si analizamos los resultados agrupándolos según el gel con el que se produjo la reparación podemos ver los resultados de la tabla 2.

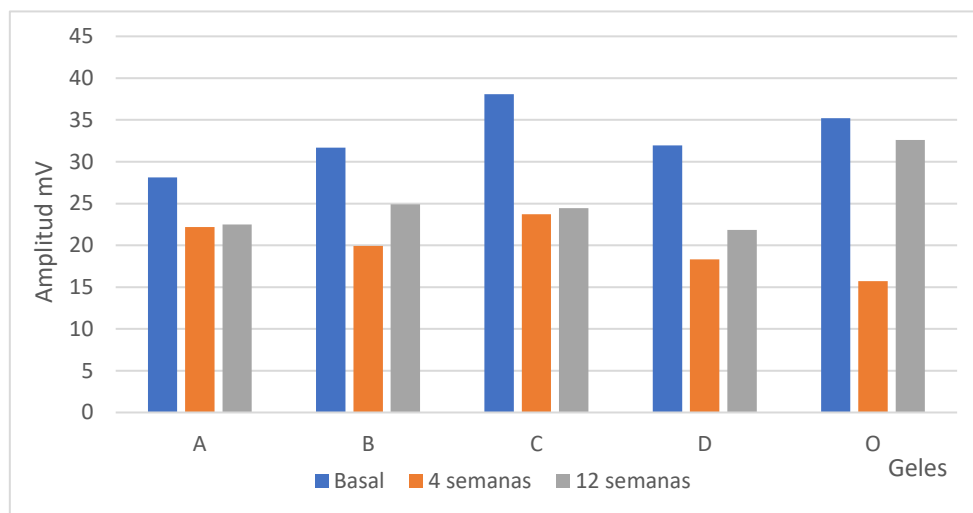


Tabla 2: Evolución amplitud máxima alcanzada agrupada por geles.

Podemos ver que la tendencia natural es a la regeneración del tejido y al aumento consiguiente de la amplitud. Todos los grupos de comparación se han comportado de la manera esperada, produciéndose el efecto esperado, descenso tras el daño y aumento con la regeneración.

## Latencia

La media de la latencia observada en las ratas no varía ni después de haber hecho el defecto muscular ni con la regeneración del tejido. La media de esta latencia en las respuestas basales, fue de 0.84 mseg con una desviación estándar de 0.11 mseg; a las 4 semanas del defecto la media fue de 0.85 mseg con una desviación estándar de 0.13 mseg. Y a las 12 semanas del defecto la media de la latencia mínima medida fue de 0.86 mseg con una desviación estándar de 0.2 mseg.

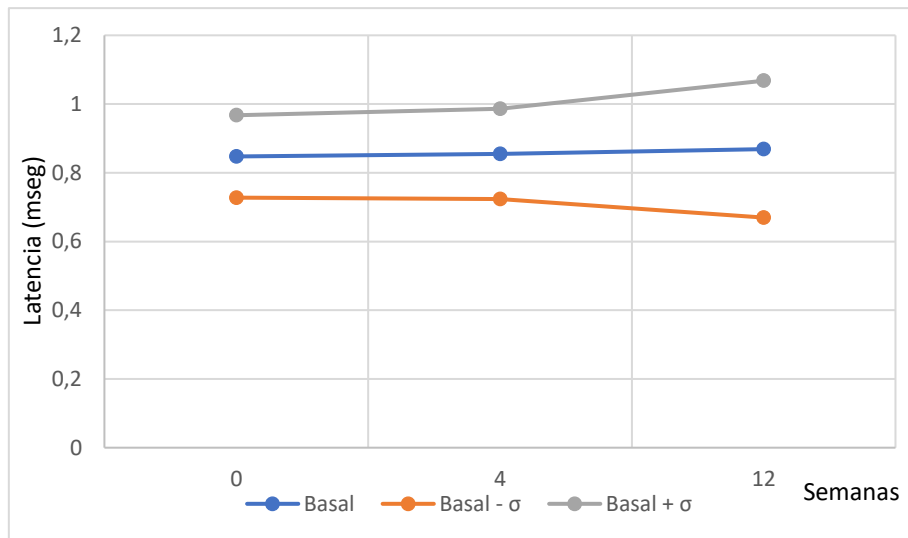


Tabla 3: evolución de la media de la latencia mínima medida de manera basal, a las 4 semanas y a las 12 semanas.

En la latencia no se produce un cambio significativo tras la realización del defecto muscular manteniéndose estable también durante la regeneración muscular.

## Homogeneidad

Definimos la homogeneidad en el experimento como el comportamiento similar dentro de un mismo gel, de manera que un mismo gel no tenga variaciones muy dispares entre patas que han sido tratadas de igual manera. Para ello hemos restado la amplitud máxima de cada pata a las 12 semanas la amplitud de las 4 semanas y calculado la desviación media agrupada por gels. Lo que vemos es la desviación media de la regeneración a partir del punto de más daño muscular.

Con este parámetro se pretende analizar la uniformidad de los geles. Las patas que han recibido geles iguales deberían comportarse de manera parecida, aunque con cierta diferencia. El estudio de la homogeneidad pretende ver si hay mucha variabilidad en la medición de la amplitud máxima en los distintos componentes.

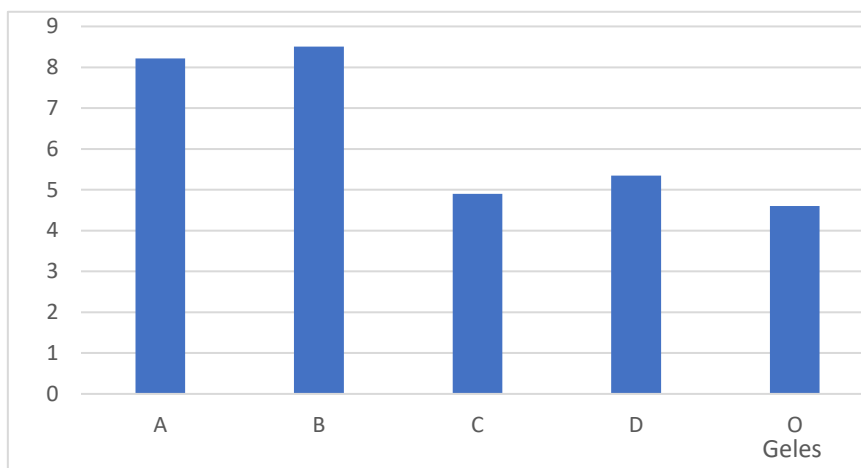


Tabla 4: Valores desviaciones medias agrupada por geles

## **DISCUSIÓN**

Los estudios electrofisiológicos se usan para estimar la fuerza del músculo<sup>29</sup>, y por tanto la regeneración, mediante la estimulación de un nervio y midiendo la respuesta eléctrica generada por la contracción de las fibras musculares. Esta información debe ser tomada con precaución<sup>30</sup> ya que se refleja la actividad eléctrica del músculo, no la fuerza mecánica<sup>14</sup>. Aunque factores como el tipo de fibra muscular, la longitud del musculo y su velocidad puede influir en la relación entre actividad mecánica y eléctrica<sup>14</sup> generalmente están relacionadas<sup>29</sup>.

Con el fin de ver cuál es el comportamiento electrofisiológico del musculo regenerado hemos medido: intensidad (mA) con la que se consigue la respuesta umbral, latencia en ms de la respuesta umbral, amplitud en mV de la respuesta umbral, intensidad en mA necesaria para conseguir la respuesta máxima, latencia en ms de la respuesta máxima y amplitud en mV de la respuesta máxima (característico de regeneración muscular). De todos estos parámetros, los más importantes de cara al análisis de regeneración funcional del musculo son la latencia y la amplitud<sup>20</sup> de la respuesta de contracción isométrica del musculo tibial anterior a la estimulación eléctrica del tronco nervioso Peroneal Común.

## Amplitud

Lo primero que debemos fijarnos es en el comportamiento de los geles. De manera general podemos ver en las medias de las amplitudes máximas [tabla 1] que tras la medición basal hay una caída de la amplitud en la 4<sup>o</sup> semana. Esto es normal, debido al defecto muscular practicado a la rata y a la consiguiente pérdida de fibras musculares, que produciría un descenso en la amplitud <sup>29</sup>. Después, hay un incremento de la amplitud media máxima en la medición de las 12 semanas. Esto es indicativo de que la regeneración se ha hecho efectiva, que se han conseguido regenerar las fibras musculares y de que las ratas poseen una recuperación funcional aceptable.

Respecto al análisis por separado de los diferentes medios [tabla 2] podemos ver que en la media de todas series se ha producido un comportamiento parecido al esperado, es decir, un descenso en la segunda medición y un incremento en la tercera respecto a la segunda. Sin embargo, en los geles A y C, los geles que tenían células madre plantadas, vemos que prácticamente la regeneración ha sido nula y que en el gel B y D, los geles acelulares, se ha producido una mayor regeneración. También podemos ver que el grupo control es el que mayor regeneración muscular presenta. Estos datos podrían correlacionarse con la histología para poder hacer comparaciones entre geles.

Comparando la amplitud máxima de las patas individualmente podemos ver que hay 3 ratas en las cuales se ha producido una respuesta distinta a la esperada. Podemos ver en [Anexo 1 tabla 7] que las ratas 4, 11, 13 han sufrido un incremento de amplitud en la segunda medición. Quizá se deba, como pasa con otras medidas, a que el músculo de la rata tiene un tiempo de regeneración muy corto <sup>17</sup>, se regenera enseguida, y hemos hecho la medición, no cuando está en el punto más bajo de fibras funcionantes, momento de final de la destrucción de las fibras dañadas, sino cuando ya se ha producido una cierta regeneración. Ante cualquier tipo de afección neuromuscular, los cambios patológicos en el músculo se verifican después de un período de 2 a 3 semanas, mientras las alteraciones en los estudios de conducción nerviosa se producen entre los 4 y los 7 días <sup>31</sup>. Al haberse medido a las 4 semanas eso indicaría que no sería el momento de mayor disminución de la amplitud.

## **Latencia**

Podemos ver en la [tabla 3] que a lo largo del tiempo no se producen grandes cambios en la medición de la latencia, ni después de realizar el defecto muscular ni con la regeneración muscular. Esto puede ser debido a que en el estudio la latencia que medimos es el tiempo de conducción/transmisión de las fibras más rápidas porque medimos al inicio de la respuesta y a que el espacio/longitud de las fibras es muy corto por lo que no se puede objetivar bien los cambios de latencia en el musculo integro y con el defecto.

Si los analizamos agrupándolos en geles [Anexo 1 tabla 5] podemos ver que tampoco se refleja una alteración con la realización del defecto muscular. Aunque en el grupo 2 y 4 se produce un aumento de la latencia a las 4 semanas y en el 1 se produce un descenso. Es llamativo que en el grupo 5 que es donde se ha producido un mayor incremento de la amplitud la latencia no varíe.

Considerando las limitaciones del estudio de la latencia, los resultados podrían indicar que el tamaño y la mielinización de las fibras permanece constante no sólo después de la producción del defecto muscular, sino también a lo largo del proceso de regeneración y que la interacción neuromuscular permanece inalterada durante el daño muscular, como muestran otros estudios<sup>33</sup>. Eso quiere decir que los nervios regenerados en los ratones tienen diámetros y mielina similares a los originales<sup>20</sup>.

## **Homogeneidad**

También quería saberse si los geles iban a provocar una regeneración similar dentro de las patas del mismo grupo. Aunque podemos ver que la desviación estándar de los geles 1 y 2 es mayor que la de 3, 4 y 5. Podemos decir que los que se han comportado de una manera más homogénea han sido los del grupo control. De manera que los músculos de las ratas no tratadas son los que tienen una evolución similar, al contrario que los de las tratadas que varían más de una pata a otra.

Podemos ver que basalmente la amplitud en mV de las ratas poseen una dispersión mayor que tras haber hecho el defecto [Tabla 4]. Esto podría ser por la diferencia en el tamaño de las ratas al inicio. Tras el defecto de las ratas la

desviación se hace menor debido a que esa diferencia de tamaño no es tan importante y el tamaño final de los músculos se ha igualado. Con la regeneración muscular vemos que las desviaciones aumentan, dando a entender que hay músculos que han regenerado más que otros.

|   | Amplitud | Latencia | Homogeneidad |
|---|----------|----------|--------------|
| A | ≈        | ↓        | ↓            |
| B | ↑        | ↑        | ↓            |
| C | ≈        | ≈        | ↑            |
| D | ↑        | ↑        | ↑            |
| O | ↑        | ≈        | ↑            |

En base a los resultados obtenidos y las limitaciones de nuestro estudio ya descritas, proponemos que, conforme a la bibliografía publicada, los posteriores estudios se realicen con menos grupos que tengan un mayor tamaño muestral y con un periodo de seguimiento menor: de 2, 4 y 8 semanas. Tampoco hacerlo antes de las 2- 3 semanas porque no se vería bien reflejada la patología <sup>31</sup>.

Además, desde un punto de vista electrofisiológico, los geles con los que se debería continuar los estudios son los geles B y D, puesto que son los que mejor respuesta reflejan en la amplitud. Si bien es cierto que no todas las características que se buscan, una disminución de la latencia y de la dispersión, son los que tienen mejor perfil.

### **CONCLUSIÓN**

La ENG ha mostrado resultados que se corresponden con el comportamiento muscular esperado, es decir, un descenso de la amplitud tras el defecto y aumento progresivo con la regeneración, por lo que nos indicaría que podría ser útil para seguir la evolución del músculo, siendo la amplitud el mejor parámetro, ya que la latencia no parece que se vea especialmente afectada por el defecto muscular, aunque requeriría de estudios de más profundidad.



Por lo que los estudios electrofisiológicos podrían ser usados tanto experimentalmente, para ver la evolución de la regeneración en las ratas, como en la práctica clínica, para poder detectar los cambios generados de manera precoz y realizar un manejo en consecuencia.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Carlson BM. *The regeneration of skeletal muscle. A review.* Am J Anat. 1973 Jun;137(2):119-49.
- 2.- Grasman JM, Zayas MJ, Page RL, Pins GD. *Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries.* Acta Biomater. 2015 Oct; 25:2-15.
- 3.- . Yang W, Hu P. J. *Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation.* Orthop Translat. 2018 Feb 7; 13:25-32.
- 4.- Chazaud B., Sonnet C., Lafuste P., Bassez G., Rimaniol A.C., Poron F., Authier F.J., Dreyfus P.A., Gherardi R.K. *Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth.* J Cell Biol. 2003 Dec 8;163(5):1133-43.
- 5.- Tidball J.G., Vallalta S.A. *Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010 May; 298(5): R1173–R1187.
- 6.- Tidball JG. *Inflammatory processes in muscle injury and repair.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005 Feb; 288(2):R345-53.
- 7.- Caseiro A.R., Pereira T., Bártolo P.J., Santos J.D., Luís A.L., Maurício A.C. *Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials Systems – Perspectives for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration.* Procedia Engineering. 2015;110,90-97.
- 8.- Järvinen T.A., Järvinen T.L., Kääriäinen M., Kalimo H., Järvinen M. *Muscle injuries: biology and treatment.* Am J Sports Med. 2005 May;33(5):745-64.

- 9.- Serrano A.L. and Munoz-Canoves P. *Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. Experimental Cell Research*, 2010. 316(18): p. 3050-8.
- 10.- Tidball JG. *Mechanisms of Muscle Injury, Repair, and Regeneration. Compr Physiol*. 2011 Oct;1(4):2029-6
- 11.- Sato, K., et al., *Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. Muscle Nerve*, 2003. 28(3): p. 365-72.
- 12.- Laumonier T, Menetrey J. *Muscle injuries and strategies for improving their repair. J Exp Orthop*. 2016 Dec;3(1):15
- 13.- Järvinen T. A., Järvinen T. L., Kääriäinen M., Kalimo H., Järvinen M. *Muscle injuries: biology and treatment. Am J Sports Med*. 2005 May;33(5):745-64.
- 14.- Roberts T.J., Gabaldón A.M. *Interpreting muscle function from EMG: lessons learned from direct measurement of muscle force. Integr Comp Biol*. 2008 Aug;48(2):312-20.
- 15.- Ming Shi, et al. *Acceleration of Skeletal Muscle Regeneration in a Rat Skeletal Muscle Injury Model by Local Injection of Human Peripheral Blood-Derived CD133-Positive Cells. Stem Cells*. 2009 Apr;27(4):949-60.
- 16.- Wu X, Corona B, Chen X, Walters T. *A Standardized Rat Model of Volumetric Muscle Loss Injury for the Development of Tissue Engineering Therapies. Bio Research Open Access*. 2012;1(6):280-290.
- 17.- Iwata A, Fuchioka S, Hiraoka K, Masuhara M, Kami K. *Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. Muscle Nerve*. 2010 May;41(5):694-701.
- 18.- Lee DH, Claussen GC, Oh S. *Clinical nerve conduction and needle electromyography studies. J Am Acad Orthop Surg*. 2004; 12:276–287.
- 19.- Daniel P. Pardini. *Manual electrofisiología*. 1º. Ediciones Díaz de Santos, S.A. 1992.

- 20.- Carlos S. Anzorandia. *El ABC de la electroneurografía*. Editorial Ciencias Médicas. 2003.
- 25.- Brian M. Sicari, et al. *A Murine Model of Volumetric Muscle Loss and a Regenerative Medicine Approach for Tissue Replacement*. *Tissue Eng Part A*. 2012 Oct; 18(19-20): 1941–1948.
26. Dong-Hee Lee. *Clinical Efficacy of Electroneurography in Acute Facial Paralysis*. April 2016. DOI: 10.7874/jao.2016.20.1.8
- 27.- Rafael B. Navarro. *Ingeniería en Electrónica. Instrumentación Biomédica. Tema 5. Electroneurografía*. Universidad de Alcalá departamento de electrónica. 2016. Disponible en: <http://docplayer.es/8425967-Universidad-de-alcala-departamento-de-electronica-ingenieria-en-electronica-instrumentacion-biomedica-tema-5-electroneurografia.html>
- 28.- Kothari MJ. Et all. *Electrodiagnostic studies: are they useful in clinical practice?*. *Arch Phys Med Rehabil*. 1998 Dec;79(12):1510-1.
- 29.- Tötösy de Zepetnek J.E., Gordon T., Stein R.B., Zung H.V. *Comparison of force and EMG measures in normal and reinnervated tibialis anterior muscles of the rat*. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991 Nov;69(11):1774-83.
- 30.- F Kanaya; J C Firrell; W C Breidenbach. *Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration*. *Plast Reconstr Surg*. 1996 Dec;98(7):1264-71
- 31.- Cuddon PA. *Electrophysiology in neuromuscular disease*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2002 Jan;32(1):31-62.
- 32.- Szmídt-Sałkowska E, Gawel M, Lipowska M. *Motor unit reorganization in progressive muscular dystrophies and congenital myopathies*. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*. Volume 49, Issue 4, July–August 2015, Pages 223-228.
- 33.- Wang H, Sorenson EJ, Spinner RJ, Windebank AJ. *Electrophysiologic findings and grip strength after nerve injuries in the rat forelimb*. *Muscle Nerve*. 2008 Oct;38(4):1254-65.

## ANEXO 1: FIGURAS Y TABLA

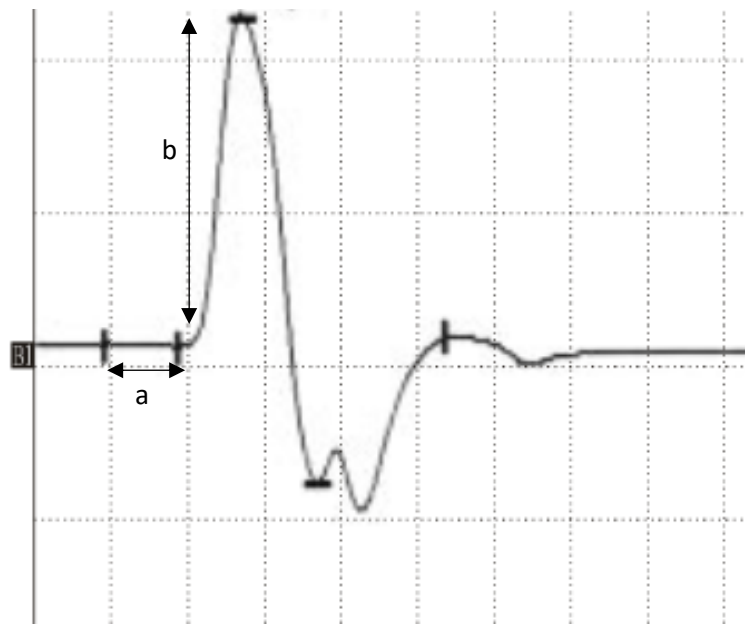


Ilustración 3. Representación de una onda. Latencia (a) y amplitud (b)

Treatment of volumetric muscle loss requires scaffolds to actively direct functional regeneration

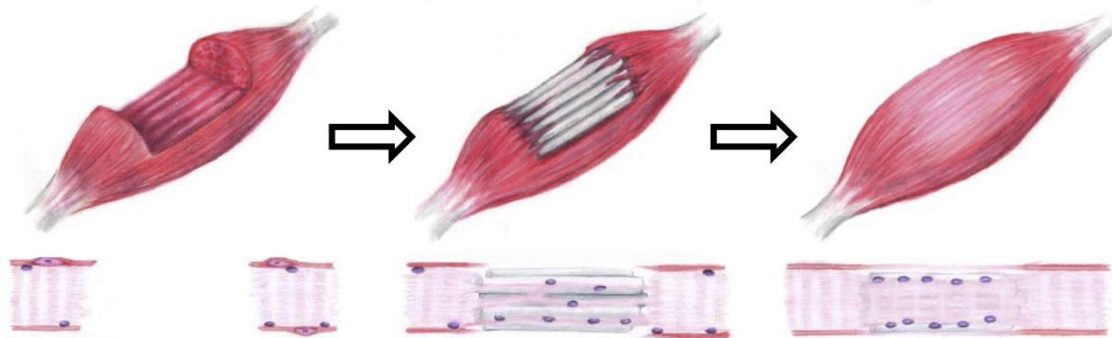


Ilustración 2: representación del defecto muscular y de la regeneración muscular. 2

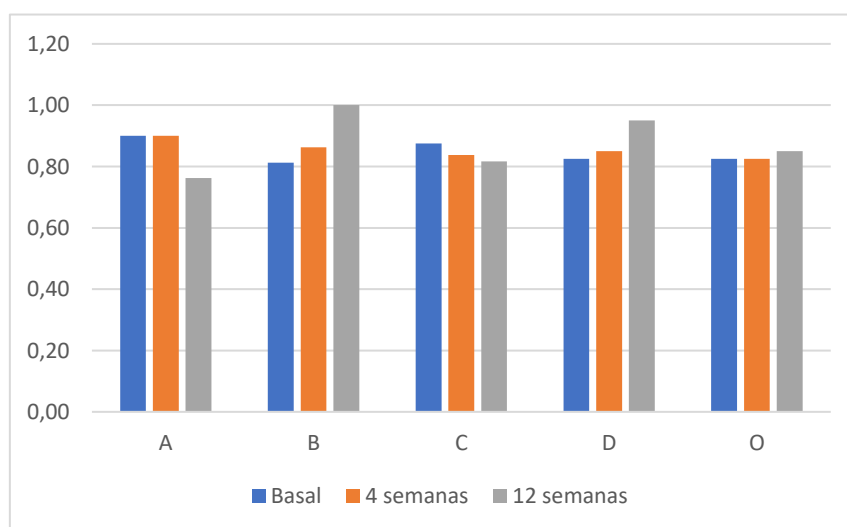


Tabla 5: Evolución de la latencia mínima agrupada por geles.

|                            |      |      |             |            |            |         |        |         |      |         |      |         |      |            |       |       |      |       |          |      |         |             |             |          |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
|----------------------------|------|------|-------------|------------|------------|---------|--------|---------|------|---------|------|---------|------|------------|-------|-------|------|-------|----------|------|---------|-------------|-------------|----------|----------|-----|---------|-----|---------|-----|------------|-------|-------|------|-----|-------|----------|------|---------|------|-----|-----|------|----|---------|-----|
| 2 00-74D-3090 IZQUIERDA A  | 1,18 | 0,85 | 5,5         | 4,31       | 0,7        | 39,8    | 0,39   | 0,8     | 1    | 9,02    | 0,8  | 27,3    | 34,3 | 26,3       | -12,5 | 0,39  | 0,85 | 11,2  | 16,5     | 0,7  | 15,1    | 2i          | 00-74D-3090 | -24,7    |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 5 00-74D-726E DERECHA A    | 1,18 | 1,05 | 1,5         | 2,75       | 1          | 19,7    | 0,78   | 1,1     | 1,3  | 27,5    | 0,95 | 12,6    | 18,2 | 11,3       | -7,1  | 0,39  | 1,35 | 1,4   | 1,18     | 0,85 | 22,9    | 5d          | 00-74D-726E | 3,2      |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 6 00-74D-49F3 IZQUIERDA A  | 0,39 | 0,8  | 15,5        | 9,02       | 0,8        | 36,1    | 1,18   | 1,1     | 3,1  | 2,35    | 0,95 | 23,6    | 20,6 | 20,5       | -12,5 | 1,18  | 0,9  | 7,6   | 32,9     | 0,7  | 22,9    | 6i          | 00-74D-49F3 | -13,2    |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 9 00-74D-5329 DERECHA A    | 1,96 | 1    | 9,1         | 3,92       | 1,1        | 16,9    | 0,78   | 0,9     | 21,1 | 11      | 0,9  | 25,2    | 7,8  | 4,1        | 8,3   | 0,39  | 1,05 | 2,4   | 8,24     | 0,8  | 29,1    | 9d          | 00-74D-5329 | 12,2     |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 3 00-74D-5996 DERECHA B    | 0,39 | 0,8  | 20,7        | 8,24       | 0,8        | 30      | 1,18   | 1,1     | 2    | 3,14    | 1    | 15,5    | 9,3  | 13,5       | -14,5 | -     | -    | -     | -        | -    | -       | 3d          | 00-74D-5996 | #IVALOR! |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 5 00-74D-726E IZQUIERDA B  | 1,18 | 0,9  | 3,9         | 7,45       | 0,8        | 35,1    | 0,39   | 1,25    | 1,1  | 10,6    | 0,7  | 20,8    | 31,2 | 19,7       | -14,3 | 1,18  | 0,85 | 1,9   | 5,88     | 0,75 | 17,6    | 5i          | 00-74D-726E | -17,5    |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 6 00-74D-49F3 DERECHA B    | 0,39 | 0,9  | 1,7         | 1,96       | 0,9        | 36,3    | 1,57   | 1,5     | 3,5  | 1,96    | 1,1  | 18,6    | 34,6 | 15,1       | -17,7 | 0,39  | 1,95 | 1,1   | 14,5     | 1,45 | 20      | 6d          | 00-74D-49F3 | -16,3    |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 8 00-74D-4860 IZQUIERDA B  | 0,78 | 0,95 | 12,7        | 18,8       | 0,75       | 25,4    | 0,39   | 0,8     | 20,1 | 17,3    | 0,65 | 20,4    | 12,7 | 0,3        | -5    | 0,39  | 0,85 | 25,1  | 6,67     | 0,8  | 37,1    | 8i          | 00-74D-4860 | 11,7     |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 1 00-74D-31E3 IZQUIERDA C  | 0,78 | 0,95 | 1,4         | 1,18       | 0,8        | 21,7    | 0,78   | 0,8     | 14,4 | 31,8    | 0,85 | 20,8    | 20,3 | 6,4        | -0,9  | 0,78  | 0,85 | 11    | 1,18     | 0,85 | 28,4    | 1i          | 00-74D-31E3 | 6,7      |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 4 00-74D-74C8 DERECHA C    | 0,78 | 0,9  | 4,1         | 1,57       | 0,8        | 54      | 0,78   | 1,1     | 22,7 | 1,96    | 1    | 24,1    | 49,9 | 1,4        | -29,9 | -     | -    | -     | -        | -    | -       | 4d          | 00-74D-74C8 | #IVALOR! |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 7 00-74D-642A IZQUIERDA C  | 0,39 | 1,05 | 35,5        | 0,39       | 1,05       | 35,5    | 0,39   | 1,2     | 5,3  | 14,5    | 0,75 | 37,1    | 0    | 31,8       | 1,6   | 0,39  | 0,8  | 32,1  | 1,18     | 0,7  | 33,6    | 7i          | 00-74D-642A | -1,9     |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 10 00-74D-4862 DERECHA C   | 0,78 | 0,95 | 7,1         | 20,4       | 0,85       | 41,2    | 0,78   | 1       | 8,7  | 9,02    | 0,75 | 13,2    | 34,1 | 4,5        | -28   | 0,78  | 0,95 | 10,2  | 2,75     | 0,9  | 11,3    | 10d         | 00-74D-4862 | -29,9    |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 2 00-74D-3090 DERECHA D    | 1,96 | 0,9  | 3,8         | 6,27       | 0,8        | 22,6    | 1,57   | 1,15    | 15,1 | 4,71    | 0,9  | 23,2    | 18,8 | 8,1        | 0,6   | 2,35  | 2,2  | 1,5   | 3,92     | 1,15 | 20,8    | 2d          | 00-74D-3090 | -1,8     |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 4 00-74D-74C8 IZQUIERDA D  | 0,39 | 0,85 | 3           | 1,57       | 0,8        | 38,7    | 0,78   | 1       | 3,2  | 5,49    | 0,75 | 28,4    | 35,7 | 25,2       | -10,3 | -     | -    | -     | -        | -    | 4i      | 00-74D-74C8 | #IVALOR!    |          |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 7 00-74D-642A DERECHA D    | 0,39 | 1,3  | 1,4         | 6,27       | 0,9        | 29,9    | 0,78   | 1,4     | 1,8  | 4,71    | 1    | 19,4    | 28,5 | 17,6       | -10,5 | 0,39  | 1,05 | 1,9   | 7,45     | 0,85 | 20,8    | 7d          | 00-74D-642A | -9,1     |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 9 00-74D-5329 IZQUIERDA D  | 0,78 | 1    | 29,6        | 6,27       | 0,8        | 36,6    | 0,39   | 0,75    | 12,2 | 0,78    | 0,75 | 12,4    | 7    | 0,2        | -24,2 | 0,78  | 0,85 | 23,1  | 1,96     | 0,85 | 24      | 9i          | 00-74D-5329 | -12,6    |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 1 00-74D-31E3 DERECHA O    | 1,57 | 0,8  | 36,1        | 4,71       | 0,8        | 36,8    | 2,75   | 1,05    | 1,7  | 16,1    | 0,7  | 13,8    | 0,7  | 12,1       | -23   | 0,78  | 0,85 | 18,5  | 55,3     | 0,6  | 37,2    | 1d          | 00-74D-31E3 | 0,4      |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 3 00-74D-5996 IZQUIERDA O  | 0,39 | 0,9  | 1,6         | 0,78       | 0,85       | 51,5    | 1,57   | 1,05    | 3,8  | 1,96    | 0,85 | 11,4    | 49,9 | 7,6        | -40,1 | -     | -    | -     | -        | -    | 3i      | 00-74D-5996 | #IVALOR!    |          |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 8 00-74D-4860 DERECHA O    | 1,18 | 1,2  | 11,7        | 5,1        | 1,05       | 24,5    | 0,39   | 1,15    | 10,2 | 0,78    | 1,05 | 16,3    | 12,8 | 6,1        | -8,2  | 0,78  | 0,9  | 27,5  | 6,67     | 0,9  | 30,3    | 8d          | 00-74D-4860 | 5,8      |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| 10 00-74D-4862 IZQUIERDA O | 0,78 | 0,7  | 22,3        | 3,53       | 0,6        | 28      | 0,39   | 0,85    | 4,7  | 4,31    | 0,7  | 17      | 5,7  | 12,3       | -11   | 0,39  | 0,9  | 20    | 4,31     | 1,05 | 30,8    | 10i         | 00-74D-4862 | 2,8      |          |     |         |     |         |     |            |       |       |      |     |       |          |      |         |      |     |     |      |    |         |     |
| NUMERO                     | CHIP | PATA | TRATAMIENTO | INT UMBRAL | PILATENCIA | UMB AMP | UMBRAL | INT MAX | PRE  | LAT MAX | PRE  | AMP MAX | PRE  | INT UMBRAL | 1LAT  | UMBRA | 1AMP | UMBRA | 1INT MAX | 1M P | LAT MAX | 1M P        | AMP MAX     | 1M P     | DIF AMPL | MAX | DIF AMP | MAX | PERDIDA | AMP | INT UMBRAL | PILAT | UMBRA | POST | AMP | UMBRA | 1INT MAX | POST | LAT MAX | POST | AMP | MAX | POST | 3m | DIF AMP | MAX |

Tabla 6: Valores de todos los datos recogidos en el estudio

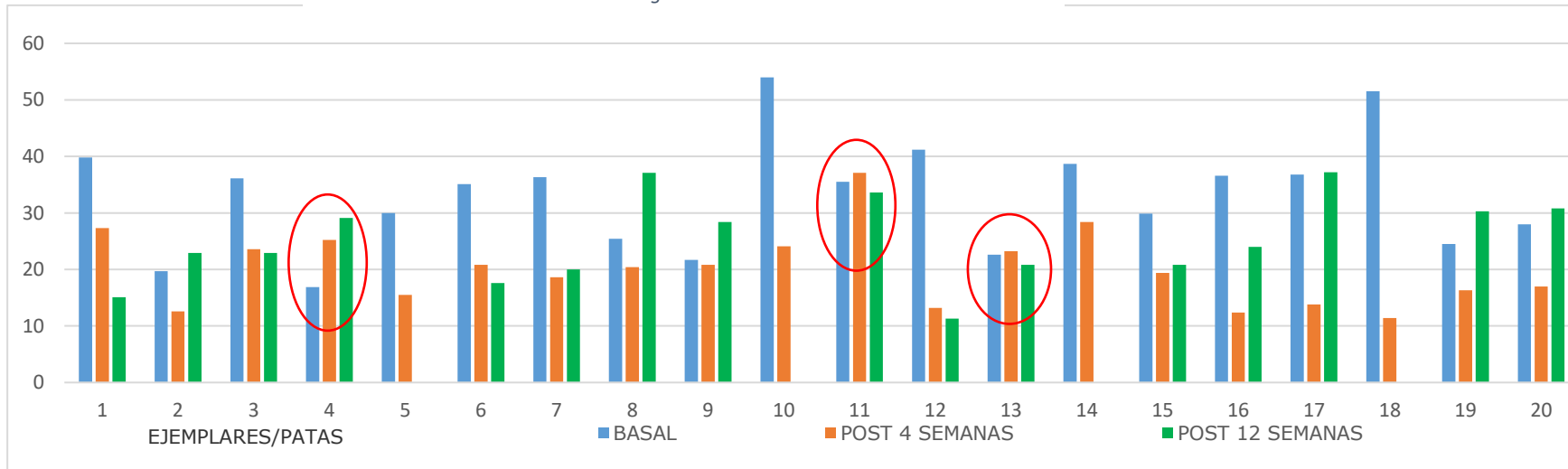


Tabla 7: Valores de la amplitud máxima mostrada de manera individual

