

ARTIGO ORIGINAL

Efeito da exposição cirúrgica de nervos e músculos no teste neurofisiológico em ratos

The effect of surgical exposure of nerves and muscles in neurophysiologic tests on rats

Elisangela Jeronymo Stipp-Brambilla¹, Adriana Maria Romão², José Antonio Garbino³, Manoel Henrique Salgado⁴, Fausto Viterboz⁵

RESUMO

O estudo neurofisiológico, na modalidade da eletroneuromiografia (ENMG), determina e quantifica a integridade de componentes da unidade motora. Os principais dados fornecidos pelo exame eletroneuromiográfico são os estudos de condução nervosa motora, sensitiva e eletromiografia. No entanto, vários fatores podem interferir sobre a resposta nervosa à eletroestimulação, tais como: idade, sexo, temperatura, umidade e outros. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da exposição cirúrgica dos nervos ciático, fibular comum, tibial e do músculo tibial cranial no teste neurofisiológico em ratos. Foram utilizados 20 ratos, Wistar, machos com aproximadamente 80 dias, divididos em dois grupos. No grupo normal o exame foi realizado

sem a exposição cirúrgica do nervo fibular. No grupo cirúrgico houve a exposição do nervo fibular comum. Com o modelo experimental utilizado, concluiu-se que o teste neurofisiológico realizado em animais com nervos e músculos expostos cirurgicamente é viável, uma vez que a alteração da temperatura do animal não interferiu significativamente nos valores dos parâmetros eletrofisiológicos observados. Além disso, a exposição de nervos e músculos permite estimular um ponto exato no nervo alvo.

Palavras-chave: Neurofisiologia, Eletromiografia, Nervo Ciático/cirurgia, Nervo Fibular/cirurgia, Ratos

ABSTRACT

The neurophysiologic study in the modality of electroneuromyography (ENMG) determined and quantified the components in the motor ambit. The main data supplied by the examination was from the motor and sensory nerve conduction studies and by electromyography. However, many factors can interfere with the nervous response to electrostimulation, such as: age, gender, temperature, humidity, and other things. The aim of this work was to verify the effect of surgical exposure of the sciatic, common fibular, tibial, and cranial tibial muscle nerves in a neurophysiologic test on rats. Twenty (20) Wistar male rats were utilized, with approximately 80 days of age, divided into two groups. In the normal group the exam was made without the surgical exposure

of the fibular nerve. In the surgical group the common fibular nerve was exposed. With the experimental model utilized, it was concluded that the neurophysiologic test done on animals with nerves and muscles surgically exposed is viable, since the alteration in animal temperature did not interfere significantly with the values of the electrophysiological parameters observed. In addition, the exposure of nerves and muscles allows stimulation of an exact point on the target nerve.

Keywords: Neurophysiology, Electromyography, Sciatic Nerve/surgery, Peroneal Nerve/surgery, Rats

- 1 Doutora, Unesp - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.
- 2 Mestre, Unesp - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.
- 3 Doutor, Instituto Lauro de Souza Lima.
- 4 Doutor, Unesp - Universidade Estadual Paulista, Campus de Bauru.
- 5 Doutor, Unesp - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Elisangela Jeronymo Stipp-Brambilla • Rua João Coelho da Silva, 193 • Jardim Eldorado – Botucatu/SP • Cep 18608-390
E-mail:elistipp@fmb.unesp.br

INTRODUÇÃO

As lesões traumáticas dos nervos periféricos com perda funcional extensa são desafios à Medicina de Reabilitação, os quais, quase sempre passam pela tentativa de tratamento cirúrgico prévio. Com o desenvolvimento e prática crescente da microcirurgia no reparo neural na tentativa de restaurar função nas lesões pronunciadas dos nervos, maior a necessidade de modelos experimentais consistentes e confiáveis. A avaliação eletrofisiológica do nervo periférico tem sido parte fundamental dos modelos experimentais para avaliar a regeneração neural e especificamente da reinervação muscular, tanto das práticas cirúrgicas como fisioterápicas.¹ Os métodos eletrofisiológicos existentes são adaptações do modelo de exame nos humanos, realizados de acordo com o animal de experiência, o nervo a ser estudado e o tipo do experimento.¹⁻⁸

O principal propósito do estudo eletrofisiológico é determinar e quantificar a função e os distúrbios do sistema nervoso periférico, especificamente os nervos sensitivos e motores, a junção neuromuscular e da unidade motora.⁹ Os principais dados fornecidos pelo exame são a localização, a extensão e características fisiopatológicas da lesão, e possibilidades de reinervação.¹⁰

Nos modelos experimentais a avaliação eletrofisiológica visa determinar a condução nervosa através do sítio ou sítios de intervenção cirúrgica e a resposta motora ao tratamento, quantificando-os o mais fidedignamente possível. Desse modo podem acompanhar a evolução de diferentes tratamentos.

Vários fatores como idade, sexo, músculo, tipo de eletrodo, sensibilidade, frequência de estímulo, filtros de frequências, alteração da temperatura e umidade podem interferir nas respostas à eletroestimulação. Assim em muitos trabalhos observam-se padronização dos parâmetros referentes ao estimulador, pré-amplificador e osciloscópio, manutenção da temperatura ambiental, manutenção da temperatura corporal do animal, e aplicação de óleo mineral para evitar a dessecação das estruturas expostas.¹¹⁻¹⁴

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da exposição cirúrgica dos nervos ciático, fibular comum, tibial e do músculo fibular no teste neurofisiológico em ratos.

MÉTODO

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, com aproximadamente 80 dias, acondicionados em local apropriado (24°C, 60-70% de umidade) em ciclo claro-escuro de 12 horas. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Botucatu, São Paulo, sob o protocolo número 493.

Os animais foram pesados e anestesiados com pentobarbital sódico 3% (30mg/Kg, i.p.) e posicionados em decúbito dorsal com tosa do membro posterior direito. Foram realizados dois grupos experimentais.

No grupo normal, o teste eletrofisiológico foi realizado sem exposição cirúrgica de nervos e músculos. Entre o eletrodo de estimulação e a pele foi utilizado um meio de condução eletrolítico para facilitar a condução elétrica.

Após realização do teste no grupo normal, para formação do grupo cirúrgico, foi realizada, no mesmo animal, incisão no membro pélvico direito permitindo exposição e dissecação do músculo tibial cranial e dos nervos ciático, tibial e fibular comum. O estímulo elétrico foi deflagrado sobre o nervo ciático por um eletrodo bipolar, especialmente produzido em forma de um gancho com o cátodo distante 2 mm do ânodo, posicionado de maneira a isolar o nervo ciático das estruturas adjacentes. O nervo tibial foi seccionado para evitar possíveis interferências de atividade do músculo gastrocnêmio.

Os animais tiveram a temperatura monitorada por um termômetro retal durante a realização do teste neurofisiológico.

Neurocondução

Foi utilizado um aparelho da marca Sapphire II 4ME. A padronização do teste foi feita quanto ao eletrodo de captação (agulhas monopolares) e sua posição no músculo alvo (eletrodo ativo na região central do músculo, o de referência próximo ao tendão de inserção muscular, de modo similar à rotina da condução nervosa motora com eletrodos de superfície para o registro do potencial de ação motor composto (PAMC).²

O eletrodo de estimulação foi especialmente construído (eletrodo de gancho, bipolar com 2 mm de distância entre o cátodo e o ânodo), a frequência de estímulo 1 pps e duração de 100µs com o eletrodo neutro (terra)

localizado na base da cauda do rato. O filtro de baixa frequência foi mantido em 0,1 Hz e o de alta frequência em 100 Hz. A intensidade do estímulo, medida em volts, foi aumentada, gradualmente, até o registro da amplitude máxima do PAMC obtida.

Os animais foram padronizados quanto à idade (80 dias), sexo (macho) e músculo onde os eletrodos de captação foram inseridos (músculo tibial cranial direito).

Após o teste os animais foram mortos com dose letal de pentobarbital sódico.

Os valores de amplitude, latência, duração e área foram comparados entre os grupos.

Análise Estatística

Considerando os resultados obtidos foram calculadas medidas representativas como média e desvio padrão. Foi utilizado o teste t' pareado com 5% de significância, para comparação dos valores de latência, amplitude, duração, área dos PAMC(s) e temperatura.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados obtidos para latência, amplitude, duração da resposta ao estímulo elétrico, área, temperatura corporal e intensidade do estímulo elétrico. A exposição cirúrgica dos nervos ciático, tibial, fibular comum e do músculo tibial cranial entre outros diminuiu significativamente a temperatura corporal, porém não alterou os resultados do teste neurofisiológico.

A intensidade de estímulo foi aumentada gradualmente até o registro da maior amplitude obtida. No grupo normal foi necessária a utilização de 47,1(± 9,3) volts; enquanto que para a obtenção de amplitude máxima no grupo cirúrgico foram necessários apenas 4,8 ± (± 0,6) volts.

Tabela 1 - Resultados do teste neurofisiológico.

Grupo	Normal	Cirúrgico
Latência (ms)	1,43 ± 0,36	1,39 ± 0,29
Amplitude (mV)	26,22 ± 7,63	27,16 ± 8,28
Área (µVs)	36,43 ± 11,37	37,34 ± 12,02
Duração (ms)	2,46 ± 0,22	2,42 ± 0,28
Temperatura (°C)	34,46 ± 0,97*	33,76 ± 1,13
Intensidade de estímulo (V)	47,1 ± 9,3*	4,8 ± 0,6

* Diferença significante (p<0.05).

DISCUSSÃO

No estudo da regeneração nervosa, valores de amplitude e latência têm se mostrado importantes aliados ao fornecer dados sobre a integridade de nervos e músculos após reparo de nervos periféricos.^{3,4,6,7}

A padronização do teste quanto à escolha dos eletrodos de captação (agulhas monopolares) e sua posição no músculo alvo, sendo o eletrodo ativo na região central do músculo, o de referência próximo ao tendão de inserção, semelhante à recomendação do “sistema ventre muscular – tendão”^{1,15} é crucial para se obter o PAMC comparável. O que não ocorre quando se utiliza o registro do potencial motor com eletrodo de agulha concêntrica.

O tipo de eletrodo de estimulação com gancho para estimular o nervo distanciando-o dos tecidos adjacentes evita a contaminação do PAMC alvo pela condução do estímulo por tecidos próximos, musculares ou nervosos, que não o nervo estudado.

A padronização técnica, assim como, a dos animais quanto à idade (80 dias) e sexo (macho), e o conjunto nervo-músculo (ciático e músculo tibial cranial direito), neste estudo, propiciou o julgamento dos autores na comparação dos dados.

A temperatura é um importante fator que pode interferir no teste eletrofisiológico, e a exposição de nervos e músculos altera a temperatura e a umidade local, podendo, portanto, alterar o resultado final da eletroneuromiografia. Os resultados corroboraram com parte desta afirmação uma vez que os animais do grupo Normal apresentaram uma temperatura significativamente maior quando comparado ao grupo Cirúrgico. Porém, não houve diferença estatística entre os valores de latência, amplitude, área e duração da resposta muscular ao estímulo elétrico. Segundo Stecker & Baylor,¹⁶ em estudo do efeito da temperatura sobre o potencial de ação nervoso, houve alterações de amplitude e área a temperaturas inferiores a 27°C, e perda permanente do potencial de ação nervoso apareceu apenas após resfriamento abaixo de 10°C por longos períodos. Assim, o resultado mostra que a diminuição da temperatura corporal (de 34,46°C para 33,76°C) pela exposição cirúrgica de nervos e músculos, neste modelo experimental, não foi suficiente para que houvesse alteração dos parâmetros eletrofisiológicos. Comprovando a viabilidade do procedimento.

Foi necessário um estímulo maior para desencadear um potencial de ação muscular no grupo Normal (47,1 ± 9,3 volts) quando com-

parado ao grupo Cirúrgico (4,8 ± 0,6 volts). Esta diferença deve-se à diminuição da resistência causada pelos tecidos existentes entre a pele e o nervo alvo no grupo normal, inexistente no grupo cirúrgico onde o estímulo foi aplicado diretamente sobre o nervo.

Além dos resultados demonstrados, pôde-se notar que a exposição cirúrgica de nervos e músculos de membros inferiores propiciou a estimulação de um ponto exato no nervo alvo. Essa possibilidade é importante em estudos sobre regeneração ou degeneração nervosa, onde são necessários estímulos proximais e/ou distais às lesões ou aos reparos cirúrgicos.

CONCLUSÃO

A diminuição da temperatura corporal dos ratos submetidos à exposição cirúrgica de nervos e músculos não foi suficiente para alterar os valores dos parâmetros eletrofisiológicos observados, validando o procedimento em análises experimentais. Além disso, a exposição cirúrgica de nervos e músculos permite estimular um ponto exato no nervo alvo facilitando a realização do teste eletrofisiológico em estudos sobre regeneração ou degeneração nervosa.

REFERÊNCIAS

- Romão AM, Viterbo F, Stipp E, Garbino JA, Rodrigues JA. Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do ervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. *Rev Bras Ortop.* 2007; 42(3):41-6.
- Garbino JA, Virmond M, Almeida JA. A técnica de estudo de condução nervosa no tatu. *Hansen Int.* 1996; 21(1): 5-13.
- Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Cordovan CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *São Paulo Med J.* 1998; 116(5):1808-14.
- Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPP. Correlações entre parâmetros obtidos das avaliações eletrofisiológica, histomorfométrica e do índice funcional após o reparo do nervo ciático do rato. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006; 64(3b):750-56.
- Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JR, Cruz OL. Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006; 72(6):775-84.
- Stipp EJ, Viterbo F, Labbé D, Garbino JA. Analysis of tibial muscle after muscular double innervation with end-to-side neurorrhaphy. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2007; 13(4): 911.
- Sandrini FA, Pereira-Júnior ED, Gay-Escoda C. Rabbit facial nerve anastomosis with fibrin glue: nerve conduction velocity evaluation. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007; 73(2):196-201.
- Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114(1):129-37.
- Robinson AJ, Snyder-Mackler L. Estudo clínico eletrofisiológico. In: Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico.* Porto Alegre: Artmed; 2002. p.319.
- Bacheschi LA, Nitrini R. Exames complementares em neurologia. In: Nitrini R, Bacheschi LA. *A neurologia que todo médico deve saber.* São Paulo: Maltese; 1991. p. 77.

- Yan YH, Yan JG, Sanger JR, Zhang LL, Riley DA, Matloub HS. Nerve repair at different angles of attachment: experiment in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2002; 18(8): 703-8.
- Papakonstantinou KC, Shiamishis G, Bates M, Terzis JK. Distraction osteogenesis using IGF-I after nerve micro-reconstruction. *J Reconstr Microsurg.* 2002; 18(5):401-10.
- Zhao S, Beurman RW, Kline DG. Neurotization of motor nerves innervating the lower extremity by utilizing the lower intercostal nerves. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13(1):39-45.
- Vekris MD, Bates M, Terzis JK. Optimal time for distraction osteogenesis in limbs with nerve repairs: experimental study in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 1999; 15(3): 231-35.
- Stalberg E, Falck B. Clinical motor nerve conduction studies. *Methods Clin Neurophysiol.* 1993; 4(3):61-80.
- Stecker MM, Baylor K. Peripheral nerve at extreme low temperatures I: effects of temperature on the action potential. *Cryobiology.* 2009; 59(1):1-11.