



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO ESPECIAL

Efeitos de dexmedetomidina perineural no nervo ciático em ratos



Abdulkadir Yektaş^{a,*}, Murat Çabalar^b, Mehmet Sar^b, Ayşin Alagöl^c,
Duygu Sultan Çelik^c, Vildan Yayla^b e Deniz Tolga^c

^a Bağcılar Training and Research Hospital, Istanbul, Turquia

^b Bakırköy Dr. Sadıkonuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Istanbul, Turquia

^c Bağcılar Eğitim ve Arastirma Hastanesi, Istanbul, Turquia

Recebido em 20 de maio de 2015; aceito em 17 de agosto de 2015

Disponível na Internet em 3 de novembro de 2016

PALAVRAS-CHAVE

Testes de latência de retirada da pata;
Medidor de analgesia;
Nervo ciático;
Eletromiografia;
Dexmedetomidina

Resumo O presente estudo foi desenvolvido para testar a hipótese de que dexmedetomidina em dose alta aumentaria a duração da antinocicepção a um estímulo térmico em modelo de rato de bloqueio do nervo ciático sem causar danos ao nervo. Os ratos foram anestesiados com isoflurano. Após os registros da eletromiografia (EMG), os nervos ciáticos direitos foram explorados e injeções perineurais foram administradas: Grupo D ($n = 7$) recebeu $40 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ de dexmedetomidina, Grupo II ($n = 6$) recebeu 0,2 mL de solução salina, Grupo III ($n = 2$) recebeu apenas exploração cirúrgica do nervo ciático direito. O tempo de latência de retirada da pata (LRP) a um estímulo térmico para ambas as patas e uma avaliação da função motora foram avaliados a cada 30 minutos após o bloqueio do nervo até o retorno à fase basal. O potencial de ação muscular composto (PAMC) dos nervos ciático direito e esquerdo foi registrado 10 vezes para cada nervo, mais uma vez, após as injeções perineurais no 14º dia. Após os registros da EMG, o nervo ciático direito e parte do esquerdo foram excisados com um comprimento de no mínimo 15 mm para exame histopatológico. A comparação das proporções da amplitude do PAMC direito/esquerdo antes e 14 dias após o procedimento mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000$). Não houve diferenças em inflamação perineural entre os grupos D, S e E aos 14 dias.

© 2016 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Paw withdrawal latency testing;
Analgesia meter;

Perineural dexmedetomidine effects on sciatic nerve in rat

Abstract The present study was designed to test the hypothesis that high dose dexmedetomidine would increase the duration of antinociception to a thermal stimulus in a rat

* Autor para correspondência.

E-mail: akyektas722000@yahoo.co.uk (A. Yektaş).

Sciatic nerve;
Electromyography;
Dexmedetomidine

model of sciatic nerve blockade without causing nerve damage. The rats were anesthetized with isoflurane. After electromyography (EMG) recordings, right sciatic nerves were explored and perineural injections were delivered: Group D ($n=7$), $40 \mu\text{g} \mu\text{g kg}^{-1}$ dexmedetomidine administration, Group II ($n=6$), (0.2 mL) saline administration, Group III ($n=2$), only surgically exploration of the right sciatic nerve. Time to paw withdrawal latency (PAW) to a thermal stimulus for both paws and an assessment of motor function were measured every 30 min after the nerve block until a return to baseline. The compound muscle action potential (CMAP) of right and left sciatic nerves were recorded 10 times per each nerve once more after perineural injections at 14 day. After EMG recordings, right and the part of left sciatic nerve were excised at a length of at minimum 15 mm for histopathological examination. Comparison of right/left CMAP amplitude ratios before and 14 days after the procedure showed a statistically significant difference ($p=0.000$). There were no differences in perineural inflammation between the Group D, Group S, and Group E at 14 days.

© 2016 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Anestesiologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

Os bloqueios de nervos periféricos são frequentemente usados em procedimentos cirúrgicos para aliviar a dor no pós-operatório e como anestesia cirúrgica. Os anestésicos locais de ação prolongada também podem fornecer analgesia durante 9-14 horas.¹⁻⁴ Quando o bloqueio é feito na parte da manhã ou da tarde, os pacientes geralmente relatam dor no período pós-operatório noturno. Os opioides causam efeitos secundários relacionados aos medicamentos e supressão do sono durante o estágio REM.⁵ O uso de opioides resulta em potencial obstrução das vias aéreas, o que diminui a saturação.⁶⁻⁸ De forma ideal, um único bloqueio de nervo periférico deve proporcionar analgesia durante a primeira noite de pós-operatório.

Abordagens anestésicas que visam a aumentar a duração do bloqueio com o objetivo de minimizar a dor no pós-operatório, com a combinação de vários anestésicos locais, estão sob investigação. A eficácia de clonidina foi comprovada em muitas técnicas anestésicas regionais.⁹ Porém, os anestésicos locais de ação prolongada produziram resultados que não são muito expressivos.^{10,11} Em alguns estudos, os autores não descobriram efeitos benéficos com a combinação de clonidina e anestésicos de ação prolongada.¹¹

Dexmedetomidina é um agonista seletivo dos adrenocéptores alfa-2. Um estudo feito anteriormente mostrou que dexmedetomidina prolonga o tempo de bloqueio sensorial e motor quando combinada com bupivacaína em modelos experimentais de ratos com bloqueio do nervo ciático.¹²

Estudos indicaram que o uso de anestésicos locais resulta em mionecrose; contudo, acredita-se que os danos podem não ser clinicamente importantes porque os músculos são normalmente regenerados.¹³⁻¹⁶ As doses de anestésicos locais são geralmente confiáveis em seres humanos saudáveis, mas podem ser neurotóxicas em pacientes diabéticos com neuropatia subclínica ou esclerose múltipla.¹⁷⁻¹⁹ Um aumento de mediadores inflamatórios foi identificado após

a administração de clonidina perineural.²⁰⁻²⁵ Um estudo relatou uma redução significativa de inflamação perineural em 24 horas (h) com a adição de dexmedetomidina à bupivacaína, em comparação com a administração de bupivacaína isolada. O mesmo estudo descobriu que os valores de inflamação perineural em 24h foram maiores em comparação com o grupo controle que recebeu solução salina e bupivacaína isolada. Os valores de inflamação perineural do grupo que recebeu a combinação bupivacaína-dexmedetomidina e do grupo que recebeu apenas dexmedetomidina foram semelhantes aos do grupo que recebeu solução salina.²⁶

Como discutido em estudos anteriores, acredita-se que a redução da inflamação perineural com o uso de dexmedetomidina seja devido à diminuição de produtos pró-inflamatórios de células imunes e ao aumento de citocinas anti-inflamatórias no local da ferida.²⁰⁻²⁵ É muito importante determinar os estados funcionais dos nervos. Um dos métodos de avaliação funcional para a cicatrização neural ou distúrbio de transmissão é a feitura de medidas eletrofisiológicas. A eletromiografia é um procedimento comum em estudos clínicos e fundamentais em avaliações da função dos nervos *in vivo* e *in vitro*. Tem amplo uso na avaliação eletrodiagnóstica de lesão do nervo periférico em modelos animais de nervo ciático. Um estudo mostrou que o uso de um tubo de silicone preenchido com ácido hialurônico após a correção término-terminal de um nervo incisado poderia ter um efeito positivo sobre a latência e o potencial de ação muscular composto (PAMC) e, conseqüentemente, sobre a regeneração axonal.²⁷ O PAMC é um parâmetro importante que geralmente mostra o período de tempo de regeneração do nervo e da reinervação.²⁸ Um estudo demonstrou que a eletromiografia de fibra única (EMGFU) é um método eletrofisiológico mais sensível para detectar o bloqueio de transmissão neuromuscular que ocorre em ratos com fraqueza muscular e toxicidade aguda por organofosfato.²⁹ Esses estudos eletromiográficos mostraram que tanto a cicatrização do nervo quanto a lesão do nervo

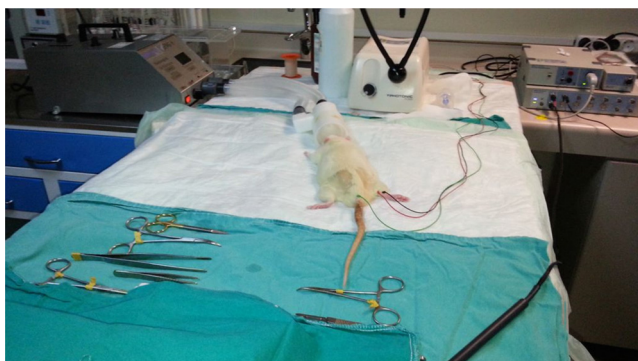


Figura 1 Sala de indução (Plexx Model: HNG6).

podiam ser mostradas com métodos eletromiográficos. Em nosso estudo, determinamos os efeitos da injeção de dexmedetomidina sobre a transmissão neural com métodos eletromiográficos.

Fizemos este estudo para avaliar os efeitos de dexmedetomidina sobre o nervo ciático de ratos por meio de analgesimetria, histopatologia e eletromiografia.

Método

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Experimentação Animal do Hospital de Ensino e Pesquisa Bağcılar mediante aprovação do Comitê de Ética obtida durante a 19ª reunião sobre o tema do projeto 2012/60, número Hadyek/2012-13, feita em 27-02-2012 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Hospital de Ensino e Pesquisa Bağcılar, Secretaria Geral de Bakırköy da Associação de Hospitais Públicos, Ministério da Saúde da República da Turquia. Este estudo foi feito de acordo com a diretriz para o uso e tratamento de animais de laboratório e diretriz para o uso e tratamento de mamíferos em estudos comportamentais feitos no contexto das ciências neurológicas. Durante o estudo, 15 ratos machos da espécie Sprague-Dawley com 400-500 g foram usados.

Preparação da droga: frascos de Precedex IV (Abbott, cloidrato de dexmedetomidina $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram diluídos em soro fisiológico a uma proporção de $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Injeção em nervo ciático subfascial

Após a pesagem, os ratos foram anestesiados com isoflurano a 2,5% em sala de indução (Plexx Model: HNG6) (fig. 1) e posicionados em decúbito lateral direito e continuaram a receber anestesia com isoflurano a 2,5% via uma máscara (fig. 1). A incisão lateral foi feita na perna que receberia a injeção. A fáscia superficial foi separada e o nervo ciático foi exposto proximalmente ao ponto de bifurcação (fig. 2). Após a exposição do nervo ciático, $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de dexmedetomidina foram injetados no espaço perineural no Grupo D ($n=7$) e soro fisiológico em volume igual ao de dexmedetomidina ($40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) foi injetado no Grupo S ($n=6$). Injetores 30G PPD foram usados para a injeção. No Grupo E ($n=2$), o nervo ciático foi somente exposto e fechado novamente. O tempo de administração da injeção foi registrado. Para determinar o local de coleta da amostra do nervo, a fáscia do



Figura 2 A fáscia superficial foi separada e o nervo ciático foi exposto em um ponto proximal à bifurcação.

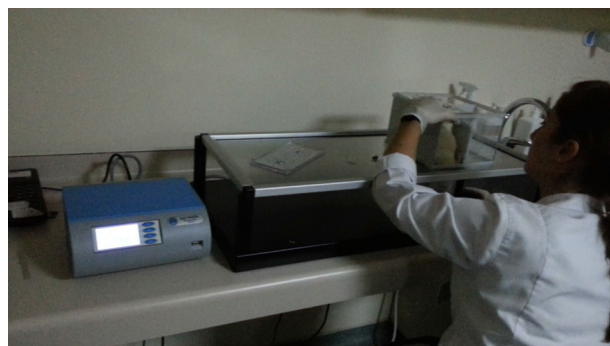


Figura 3 Teste de LRP.

músculo bíceps femoral correspondente ao local da injeção foi marcada com suturas não absorvíveis sob a pele enquanto a preparação da pele era feita. As suturas não foram feitas ao redor do nervo e não tocavam o nervo. Após as injeções, as dobras de incisão foram fechadas. A anestesia com isoflurano foi interrompida e o tempo de interrupção da anestesia foi registrado; os ratos foram colocados em suas gaiolas em supinação. Em seguida, os tempos em que os ratos voltaram à pronação foram registrados como recuperação do reflexo de endireitamento (RRE).

Teste de latência de retirada da pata (LRP)

Após o retorno dos ratos à pronação, um medidor de analgesia plantar (Série 8 modelo 336T, IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA) foi colocado na câmara do medidor de analgesia plantar para fazer o teste de LRP (fig. 3). A fonte de luz foi usada como um aquecedor no medidor de analgesia. Após ligar a fonte de luz e a temperatura atingir 30°C no ponto correspondente da pata do rato, um tempo de espera de 5 minutos (min) foi permitido, a pata do rato foi movida para um ponto correspondente. Esse procedimento foi repetido para ambas as patas (direita e esquerda).

Os ratos sem sinais de anormalidade neurocomportamental foram mantidos em ambientes com ciclos claro/escuro de 12 h, do início ao fim da experiência (entre 6-18 h). Antes da cirurgia, uma hora de monitoração neurocomportamental foi feita durante três dias. Um teste térmico de LRP foi feito e as médias dos valores registrados durante esses três dias foram consideradas como valores basais; esse procedimento foi repetido para as patas direita e esquerda. Após os ratos serem levados para a cirurgia e receberem a injeção, uma mensuração da LRP foi feita consequentemente a cada

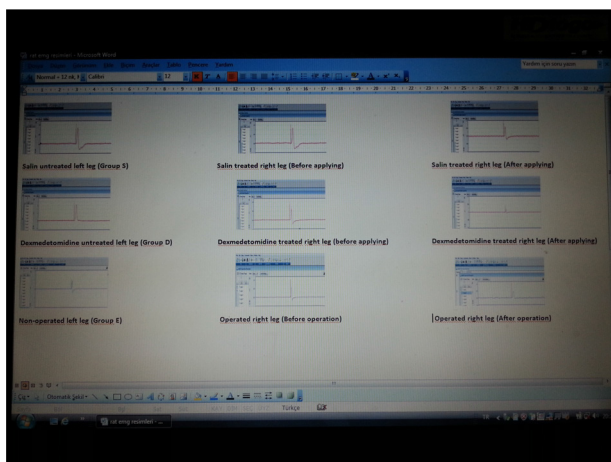


Figura 4 Amplitude pico a pico do potencial de ação muscular composto (PAMC) e latência motora distal dos nervos ciáticos direito e esquerdo.

30 min e esse procedimento foi feito em ambas as patas, direita e esquerda. Monitoração neurocomportamental foi feita em todos os ratos por 210 min. Nesse período, uma avaliação motora do membro traseiro foi novamente feita a cada 30 min. Os resultados foram registrados como presença de bloqueio motor (bloqueio motor = 1), posição normal da pata ou ausência de bloqueio motor (bloqueio motor = 0). Quando os ratos retornaram aos seus valores basais sensoriais e motores, eles foram recolocados em suas gaiolas. Antes de remover os nervos dos ratos no local da injeção, mensurações da LRP de ambas as patas foram feitas cinco vezes todas as manhãs, a partir da manhã após a injeção até a remoção do nervo. Os valores diários de LRP foram considerados como a média dessas mensurações.

Eletrofisiologia

Após serem anestesiados com isoflurano a 2,5%, os ratos foram posicionados em decúbito dorsal e suas caudas foram fixadas na plataforma de trabalho. O eletrodo de agulha foi colocado no músculo gastrocnêmio e o nervo ciático foi estimulado 10 vezes com um eletrodo de superfície em abordagem supramaxilar em um ponto adequado proximal à articulação do quadril (fig. 1). A amplitude pico a pico do potencial de ação muscular composto (PAMC) e a latência motora distal dos nervos ciáticos direito e esquerdo foram registradas (fig. 4). Para o estudo eletrofisiológico, um sistema de eletromiografia (Biopac Systems, Inc., Modelo: MP150) foi usado e para a avaliação das mensurações usamos o programa LabChart 7. O mesmo procedimento foi feito após a administração da anestesia com isoflurano, antes da injeção no nervo ciático e no 14º dia após a injeção no nervo ciático, antes de recolher uma amostra do nervo ciático, e os resultados foram comparados.

Histopatologia

No 14º dia, após a anestesia com isoflurano para o primeiro estudo eletrofisiológico e injeção da droga no nervo ciático, os ratos foram novamente anestesiados com isoflurano e a

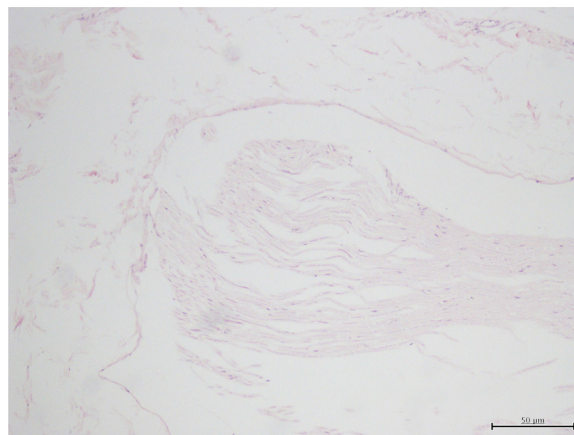


Figura 5 Imagens microscópicas do nível-0 de inflamação perineural.

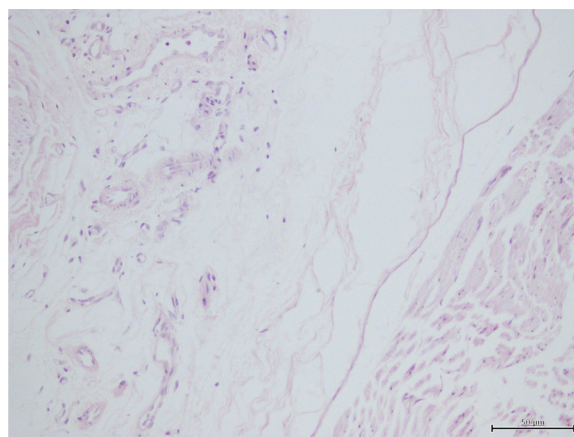


Figura 6 Imagens microscópicas do nível-1 de inflamação perineural.

eletrofisiologia foi feita. O local da incisão anterior na extremidade traseira direita foi aberto, a sutura de marcação foi localizada e uma amostra do nervo ciático de 1,5 cm de comprimento foi coletada do local correspondente. O mesmo procedimento foi repetido para a extremidade traseira esquerda. As amostras dos nervos foram fixadas em gliceraldeído a 2,5% durante três dias e, em seguida, embebidas em blocos de parafina e submetidas a cortes transversais de 5 µm. Essas amostras foram coradas com eosina e analisadas. As seguintes características foram identificadas: inflamação perineural do nervo ciático (figs. 5-8) (0 = sem inflamação, 1 = edema e/ou inflamação leve em pequenos focos, 2 = edema e/ou inflamação moderada em ampla área local, 3 = edema e/ou inflamação moderada em áreas difusas, lesões nervosas localizadas) (0 = sem lesões, 1 = lesões em 1-2% dos axônios ou mielinas, 2 = lesões em 2-5% dos axônios ou mielinas, 3 = lesões em mais de 5% dos axônios ou mielinas). Após a remoção do nervo ciático, os ratos foram submetidos a eutanásia, com o método de deslocamento cervical.

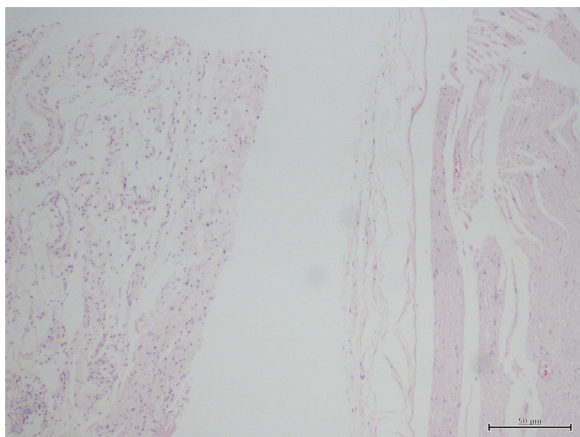


Figura 7 Imagens microscópicas do nível-2 de inflamação perineural.

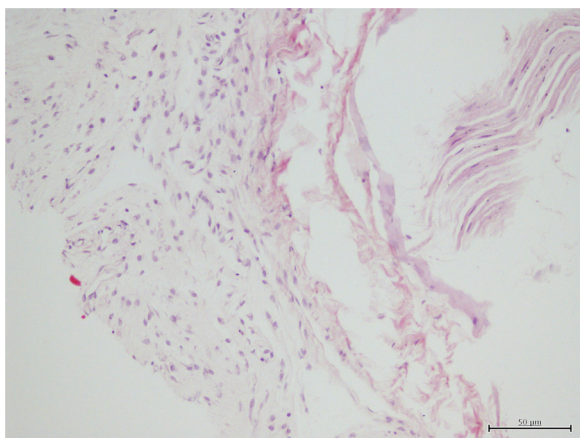


Figura 8 Imagens microscópicas do nível-3 de inflamação perineural.

Estatística

Os cálculos estatísticos foram feitos com o programa SPSS 11.5 para Windows. A comparação entre os grupos dos tempos de anestesia, valores da RRE e valores da inflamação histopatologicamente feita e das lesões locais nos nervos foi feita com o uso dos testes NPar e de Kruskal-Wallis. Nos casos em que houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, as diferenças foram comparados individualmente com os testes NPar e *U* de Mann-Whitney. Os valores basais de LRP traseiras direita e esquerda e os valores de LRP nos minutos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 nos dias 1-14 para cada grupo foram comparados durante os testes NPar e o teste de sinais de Wilcoxon. Os valores do PAMC e da latência entre os três grupos foram comparados com o teste Anova. A comparação dos valores eletromiográficos foi feita antes da administração da droga e no 14º dia após a sua administração e a comparação dos valores eletromiográficos antes e depois da administração da droga foi feita entre os grupos com o teste *t* pareado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os dados.

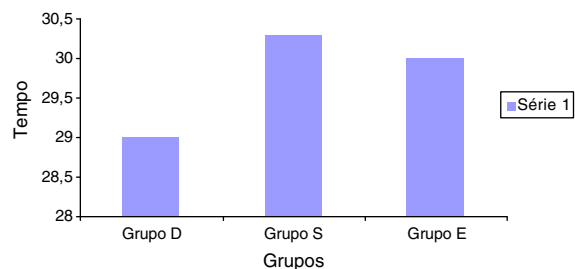


Figura 9 Comparação da duração da anestesia nos grupos.

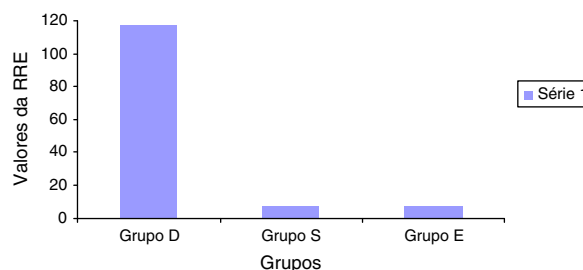


Figura 10 Comparação da recuperação do reflexo de endireitamento (RRE) nos grupos.

Resultados

Quando as durações da anestesia fornecida durante a administração das injeções aos ratos foram comparadas, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,823$) (fig. 9).

Quando os valores da RRE foram comparados entre os grupos, observamos diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,005$). Quando os grupos foram comparados individualmente, os valores da RRE no Grupo D foram estatisticamente diferentes dos valores dos outros dois grupos; os valores de RR foram maiores em comparação com os dos outros dois grupos (Grupo D-Grupo S: $p = 0,003$, Grupo D-Grupo E: $p = 0,040$) (fig. 10).

Grupo D

Quando os valores de LRP traseira direita dos ratos foram comparados com os valores basais, constatou-se que os valores de LRP eram inferiores aos valores basais aos 30 min após a administração da droga e maiores aos 210 min. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores medidos aos 60, 90, 120, 150 e 180 minutos ($p = 0,018 - p = 0,237 - p = 0,237 - p = 0,735 - p = 0,499 - p = 0,091 - p = 0,028$) (fig. 11).

Quando os valores de LRP traseira esquerda dos ratos foram comparados com os valores basais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas aos 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos ($p = 0,044 - p = 0,138 - p = 0,067 - p = 0,54 - p = 0,128 - p = 0,098 - p = 0,056$) (fig. 12).

Quando os valores de LRP traseira direita dos ratos foram comparados com os valores basais, não observamos diferenças estatisticamente significativas nos dias 1, 8, 9 e 14; entretanto, os tempos de LTP foram estatística e significativamente mais longos nos outros dias, em comparação com os valores basais (Dia 1: $p = 0,735$; Dia 2: $p = 0,028$;

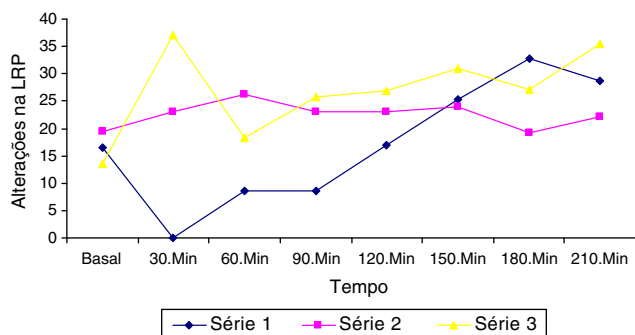


Figura 11 Tempos de alterações na latência de retirada da pata (LRP) traseira direita nos grupos (Série 1, Grupo D; Série 2, Grupo S; Série 3, Grupo E).

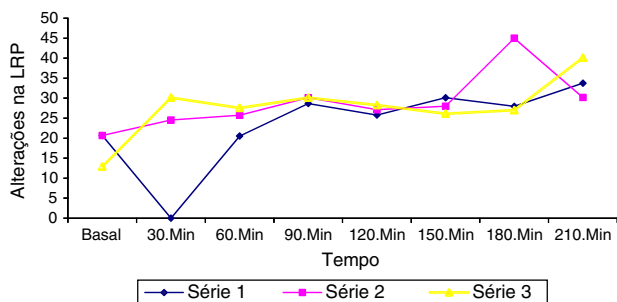


Figura 12 Tempos de alterações na latência de retirada da pata (LRP) traseira esquerda nos grupos (Série 1, Grupo D; Série 2, Grupo S; Série 3, Grupo E).

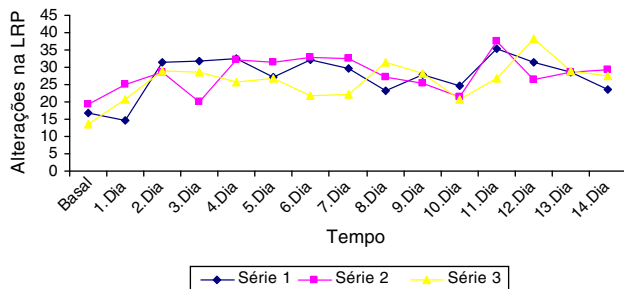


Figura 13 Tempos de alterações na latência de retirada da pata (LRP) traseira direita nos grupos após a injeção (Série 1, Grupo D; Série 2, Grupo S; Série 3, Grupo E).

Dia 3: $p=0,018$; Dia 4: $p=0,028$; Dia 5: $p=0,043$; Dia 6: $p=0,018$; Dia 7: $p=0,028$; Dia 8: $p=0,128$; Dia 9: $p=0,063$; Dia 10: $p=0,028$; Dia 11: $p=0,018$; Dia 12: $p=0,028$; Dia 13: $p=0,663$; Dia 14: $p=0,128$) (fig. 13).

Quando os valores de LRP traseira esquerda dos ratos foram comparados com os valores basais, observamos que houve uma diferença estatisticamente significativa nas mensurações feitas nos dias 4-6 e 9-12 ao longo dos 14 dias e que eram maiores que os valores basais (Dia 1: $p=0,612$; Dia 2: $p=0,018$; Dia 3: $p=0,063$; Dia 4: $p=0,018$; Dia 5: $p=0,018$; Dia 6: $p=0,018$; Dia 7: $p=0,091$; Dia 8: $p=0,128$; Dia 9: $p=0,028$; Dia 10: $p=0,125$; Dia 11: $p=0,028$; Dia 12: $p=0,018$; Dia 13: $p=0,028$; Dia 14: $p=0,063$) (fig. 14).

Não houve bloqueio motor em qualquer dos ratos no Grupo D.

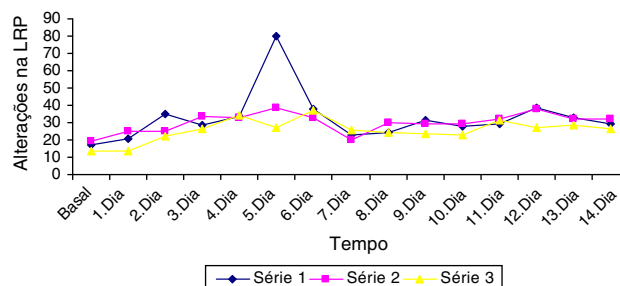


Figura 14 Tempos de alterações na latência de retirada da pata (LRP) traseira esquerda nos grupos após a injeção (Série 1, Grupo D; Série 2, Grupo S; Série 3, Grupo E).

Grupo S

Quando os valores de LRP traseira direita dos ratos foram comparados com os valores basais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos (fig. 11).

Quando os valores de LRP traseira esquerda dos ratos foram comparados com os valores basais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos (fig. 12).

Quando os valores de LRP traseira direita dos ratos foram comparados com os valores basais, não houve diferenças significativas nos dias 4-7, 10, 11 e 14, eram maiores que os valores basais (Dia 1: $p=0,345$; Dia 2: $p=0,116$; Dia 3: $p=0,600$; Dia 4: $p=0,046$; Dia 5: $p=0,046$; Dia 6: $p=0,028$; Dia 7: $p=0,028$; Dia 8: $p=0,075$; Dia 9: $p=0,207$; Dia 10: $p=0,046$; Dia 11: $p=0,028$; Dia 12: $p=0,116$; Dia 13: $p=0,116$; Dia 14: $p=0,028$) (fig. 13).

Quando os valores de LRP traseira esquerda dos ratos foram comparados com os valores basais, não houve diferenças estatisticamente significativas nos dias 3-14, eram maiores que os valores basais (Dia 1: $p=0,116$; Dia 2: $p=0,173$; Dia 3: $p=0,046$; Dia 4: $p=0,046$; Dia 5: $p=0,028$; Dia 6: $p=0,028$; Dia 7: $p=0,917$; Dia 8: $p=0,046$; Dia 9: $p=0,028$; Dia 10: $p=0,116$; Dia 11: $p=0,028$; Dia 12: $p=0,046$; Dia 13: $p=0,028$; Dia 14: $p=0,046$) (fig. 14).

Não houve bloqueio motor em qualquer dos ratos no Grupo S.

Grupo E

Quando os valores de LRP traseira direita dos ratos foram comparados com os valores basais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos (fig. 11).

Quando os valores de LRP traseira esquerda dos ratos foram comparados com os valores basais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos (fig. 12).

Quando os valores de LRP traseira direita dos ratos foram comparados com os valores basais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos Dias 1-14 (fig. 13).

Quando os valores de LRP traseira esquerda dos ratos foram comparados com os valores basais, não foram

Tabela 1 Amplitudes do PAMC e latências dos nervos ciáticos direito e esquerdo pré-injeção e 14 dias pós-injeção

	Amplitude do PAMC mV	Latência ms
Pré-injeção-D	0,40–1,98 0,8251 ± 0,3862	0,007–0,013 0,010 ± 0,001
Pré-injeção-E	0,21–2,09 0,8729 ± 0,4716	0,008–0,014 0,011 ± 0,001
<i>P</i>	0,137	0,083
Pós-injeção-D	0,00–1,39 0,3285 ± 0,2640	0,006–0,031 0,013 ± 0,006
Pós-injeção-E	0,10–1,32 0,4294 ± 0,2786	0,007–0,017 0,012 ± 0,003
<i>P</i>	0,000	0,618

Houve diferença estatisticamente significativa entre e após a injeção D na amplitude do PAMC e após a injeção E na amplitude do PAMC, $p=0,000$.

observadas diferenças estatisticamente significativas nos Dias 1-14 (fig. 14).

Não houve bloqueio motor em qualquer dos ratos no Grupo E.

Quando os nervos ciáticos direitos dos ratos foram comparados histopatologicamente, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação à inflamação local e ao dano dos nervos ($p=0,633 - p=0,867$).

Quando os nervos ciáticos esquerdos dos ratos foram comparados histopatologicamente, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação à inflamação local e ao dano dos nervos ($p=0,751 - p=0,668$).

Quando os nervos direito e esquerdo do Grupo D foram comparados em relação aos resultados histopatológicos, não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de inflamação local e dano dos nervos ($p=0,891 - p=0,705$).

Quando os nervos ciáticos direito e esquerdo do Grupo S foram comparados em relação aos resultados histopatológicos, não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de inflamação local e dano dos nervos ($p=0,194 - p=0,317$).

Quando os nervos ciáticos direito e esquerdo do Grupo E foram comparados em relação aos resultados histopatológicos, não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de inflamação local e dano dos nervos ($p=1,000 - p=0,317$).

Quando os grupos D, S e E foram comparados em relação ao PAMC e aos valores de latência antes e depois da injeção, houve diferenças estatisticamente significativas nos valores do PAMC pós-injeção ($p<0,001$) (tabela 1). Não houve diferenças estatisticamente significativas em relação aos valores de latência ($p=0,618$) (tabelas 1 e 2).

As mensurações do PAMC pós-injeção foram estatística e significativamente diferentes entre o Grupo D e Grupo S ($p=0,016$).

Houve diferenças estatisticamente significativas entre o Grupo D e Grupo S em relação às mensurações do PAMC pós-injeção ($p=0,015$).

Quando as mensurações do PAMC pós-injeção do Grupo S e Grupo E foram comparadas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p=0,95$).

Quando os valores de latência pré-injeção foram comparados entre os grupos D, S e E, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p=0,137 - p=0,083$) (tabelas 1 e 2).

Quando os valores do PAMC pré- e pós-injeção no Grupo D foram comparados, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores do PAMC pré- e pós-injeção nos grupos S e E ($p=0,126 - p=0,548$).

Discussão

Este é um estudo randomizado, controlado por placebo e cego, no qual demonstramos que doses elevadas de dexmedetomidina causaram bloqueio sensorial no nervo ciático de ratos sem causar qualquer efeito histopatologicamente tóxico; porém, os efeitos dessas doses elevadas na transmissão neural não foram avaliados eletromiograficamente.

Descobriu-se que dexmedetomidina inibiu os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular por meio da supressão I_h de neurônios do núcleo hipotalâmico, que são controlados por fluxos ativados por hiperpolarização e em contato direto com os neurônios noradrenérgicos são denominados I_h (fluxo-H), e de neurônios do núcleo hipotalâmico de ratos por meio da ativação do par de proteínas-G, que regula internamente o fluxo de K^+ .³⁰ Em estudo *in vitro* de neurônios do gânglio dorsal de ratos, descobriu-se que a combinação tanto de clonidina quanto de dexmedetomidina com lidocaína produziu um tipo aditivo de interação do bloqueio no fluxo de Na^+ resistente à tetrodotóxina.³¹

Um estudo feito anteriormente mostrou que o aumento da dose de dexmedetomidina em combinação com ropivacaína resultou em uma duração maior do bloqueio sensorial e motor por meio da estimulação térmica em ratos.²⁶ O tempo de bloqueio sensorial intenso e o tempo para voltar às funções sensoriais normais aumentou de uma forma dependente da dose, com o aumento gradual das doses de dexmedetomidina.²⁶ Outro estudo também relatou que o bloqueio sensorial e motor em bloqueio do nervo ciático de ratos apresentou aumento significativo com altas doses de dexmedetomidina adicionada à bupivacaína.³² Não usamos anestésicos locais em nosso estudo. No Grupo D, administramos dexmedetomidina ($40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) apenas no espaço perineural do nervo ciático direito. Aos 30 min após a administração da droga no Grupo D, os valores de LRP direita foram estatística e significativamente inferiores aos valores basais e os valores de LRP direita foram estatisticamente maiores do que os valores basais aos 210 min. Os valores de LRP esquerda foram estatisticamente baixos aos 30 min em comparação com os valores basais. A razão pela qual os valores de LRP direita foram menores do que os valores basais aos 30 min foi que o reflexo de endireitamento não foi recuperado em qualquer dos ratos; portanto, a mensuração da LRP não pôde ser feita. Quando os valores de LRP direita e esquerda dos grupos S e E foram comparados com os valores basais, não houve diferenças estatisticamente significativas. Quando os valores de LRP direita nos dias 1, 8,

Tabela 2 Variações da amplitude do PAMC dos nervos ciáticos direito e esquerdo dos grupos

	Total	Grupo D	Grupo S	Grupo E
Pré-injeção-D/E	0,37–2,26 1,0641 ± 0,3965 ^a			
Pós-injeção-D/E	0,13–3,15 0,8456 ± 0,5016	0,13–2,07 0,7297 ± 0,3608 ^{a,b}	0,27–3,15 0,9744 ± 0,6155 ^b	0,31–1,69 0,8064 ± 0,4018

Diferenças significativas entre o Grupo D.

^a Todo o grupo.

^b Grupo S.

9 e 14 foram comparados com os valores basais, não houve diferenças estatisticamente significativas. Contudo, houve diferença estatisticamente significativa na comparação dos valores de LRP nos outros dias e foram maiores do que os valores basais. No Grupo D, houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de LRP esquerda que foram superiores aos valores basais nos dias 4-6, 9-12. No Grupo S, houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de LRP que foram superiores aos valores basais nos Dias 4-7, 10, 11 e 14. Houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de LRP esquerda que foram superiores aos valores basais nos Dias 3-6, 8-9, 11-14. No Grupo E, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de LRP comparados com os valores basais nos dias de pós-operatório, nos casos submetidos à abertura e fechamento cirúrgico. Um estudo mostrou que o efeito de dexmedetomidina atingiu grau significativo apenas quando foi adicionada à bupivacaína e os efeitos analgésicos centrais de dexmedetomidina foram rejeitados como a razão para o aumento da duração do bloqueio sensorial.³² O uso isolado de dexmedetomidina não pode produzir um bloqueio sustentável tanto motor quanto sensorial em grau significativo.³² Clonidina não produziu analgesia adequada quando usado como único anestésico em bloqueio de plexo braquial humano.³³ De forma semelhante, demonstrou-se que dexmedetomidina aumentou a duração do bloqueio sensorial e motor e a duração da analgesia quando adicionado à bupivacaína para o bloqueio do plexo braquial supraclavicular.³⁴ A analgesia em ratos com o uso de dexmedetomidina adicionada à ropivacaína em bloqueio do nervo periférico é obtida graças aos efeitos periféricos. Nesse estudo, o grupo que recebeu dexmedetomidina isolada desenvolveu um bloqueio sensorial curto e parcial.³⁵ Nosso estudo mostrou que dexmedetomidina resultou no prolongamento da LRP não apenas no nervo ciático direito, onde foi injetada no espaço perineural, mas também no nervo ciático esquerdo em dias específicos após a administração da droga. O mesmo efeito também foi observado no Grupo S. Esse efeito não foi observado no Grupo E. Portanto, não seria correto atribuir esses prolongamentos à dexmedetomidina; no entanto, esses efeitos podem ser atribuídos a intervenções no espaço perineural. Estudos adicionais sobre o tema devem ser conduzidos. Porém, os mesmos prolongamentos na LRP do Grupo D e Grupo S também ocorreram nos nervos ciáticos esquerdos. Os nervos ciáticos esquerdos não foram submetidos a intervenções cirúrgicas. Essa é uma questão que merece uma investigação mais detalhada.

Quando uma dose elevada de dexmedetomidina é adicionada à bupivacaína em bloqueio do nervo ciático de ratos, o bloqueio é intensificado.³⁶

Quando dexmedetomidina é administrada por via intravenosa, analgesia e sedação são geradas sem causar depressão respiratória.³⁷⁻⁴⁰ Pode mudar a percepção sensorial por meio de analgesia e sedação centralmente eficazes.³⁷⁻⁴⁰ Ao contrário dos resultados de um estudo anterior no qual todos os ratos receberam bloqueio bilateral do nervo isquiático com bupivacaína isolada e bupivacaína reforçada com dexmedetomidina,³⁶ os resultados de outro estudo no qual o bloqueio foi unilateral mostraram que os efeitos de dexmedetomidina foram dominantes no nível dos nervos periféricos.²⁶ Dexmedetomidina em dose muito elevada (20 µg.kg⁻¹) tem efeitos sistêmicos muito fortes que prolongam ainda mais a recuperação do reflexo de endireitamento (RRE) em um grau significativo.²⁶ Em nosso estudo, o tempo de RRE no Grupo D foi significativamente maior que os dos outros grupos.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* foram feitos para avaliar se dexmedetomidina tem efeitos tóxicos sobre as células nervosas. Schoeler et al.⁴¹ expuseram fatias organotípicas de hipocampo à dexmedetomidina e criaram um trauma mecânico focal para mostrar que dexmedetomidina proporciona um efeito neuroprotetor em um modelo de trauma cerebral *in vitro*. Sanders et al.⁴² mostraram que dexmedetomidina impediu a apoptose cortical em condições *in vitro* e *in vivo*. Em outro estudo, a combinação de bupivacaína e dexmedetomidina foi comparada com bupivacaína isolada e foi associada à inflamação perineural significativamente menor em 24h.³⁶

Um estudo observou achados que indicaram que dexmedetomidina (5 ou 10 µg) injetada no espaço epidural em coelhos resultou em desmielinização de oligodendrócitos na substância branca da medula espinal.⁴³ No entanto, relatou-se que os efeitos neurotóxicos de dexmedetomidina epidural poderiam ser devidos à lesão dos recursos vasculares da medula espinal devido ao efeito do pH ou aos efeitos diretos da inserção do cateter epidural.⁴³ Em um estudo,¹² foi surpreendente verificar que os nervos ciáticos não afetaram a mielina ou axônios ou quando dexmedetomidina foi administrada em dose de 28-40 µg.kg⁻¹; porém, causou um dano significativo na mielina quando administrada por via epidural em coelhos em dose de 6,25 µg.kg⁻¹.⁴³ Os valores da inflamação perineural no grupo que recebeu bupivacaína reforçada com dexmedetomidina e no grupo que recebeu bupivacaína isolada foram semelhantes aos do grupo controle, que recebeu solução salina.¹² Essa situação

foi atribuída à capacidade de os agonistas alfa-2 reduzirem a resposta inflamatória.^{20-23,25,44,45} No estudo que fizemos, não houve diferenças estatisticamente significativas em todos os três grupos em relação aos achados histopatológicos de inflamação local e danos aos nervos no espaço perineural nas secções transversais dos nervos ciáticos direito e esquerdo.

De acordo com nossa pesquisa, não encontramos estudo na literatura que comparasse os valores eletromiográficos antes e após a injeção de dexmedetomidina no nervo ciático. A avaliação da latência é uma indicação de axônios funcionais, número e qualidade dos axônios válidos e, portanto, do estado funcional dos neurônios motores que são estudados.⁴⁶ Não houve diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos quanto aos valores de latência pré- e pós-injeção em nosso estudo. Em nosso estudo, os valores do PAMC pós-injeção no Grupo D foram estatística e significativamente diferentes em comparação com os outros grupos e diminuíram após a injeção. No Grupo D, os valores do PAMC pré- e pós-injeção também foram estatística e significativamente diferentes e diminuíram após a injeção. No PAMC, três valores são registados com base no músculo estudado: 1 – o tamanho da unidade motora inervada por axônios; 2 – o tamanho das fibras nervosas motoras que respondem ao estímulo; 3 – a sincronização das suas respostas.⁴⁷

Em conclusão, a injeção de dexmedetomidina perineural em nervo ciático de ratos prolongou o valor de LRP em 210 min e prolongou os valores de LRP pós-injeção nos dias 2-7 e 10-13. A duração da RRE foi prolongada em nível estatisticamente significativo nos ratos que receberam injeção de dexmedetomidina perineural. A injeção perineural de dexmedetomidina no nervo ciático não resultou em aumento estatisticamente significativo de inflamação perineural ou danos locais nos nervos; entretanto, os valores do PAMC no dia 14 após a injeção perineural de dexmedetomidina no nervo ciático foram estatística e significativamente mais baixos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Casati A, Fanelli G, Albertin A, et al. Interscalene brachial plexus anesthesia with either 0.5% ropivacaine or 0.5% bupivacaine. *Minerva Anesthesiol.* 2000;66:39-44 [PubMed: 10736981].
- Hickey R, Hoffman J, Ramamurthy S. A comparison of ropivacaine 0.5% and bupivacaine 0.5% for brachial plexus block. *Anesthesiology.* 1991;74:639-42 [PubMed: 2008942].
- Hickey R, Rowley CL, Candido KD, et al. A comparative study of 0.25% ropivacaine and 0.25% bupivacaine for brachial plexus block. *Anesth Analg.* 1992;75:602-6 [PubMed: 1530173].
- Vaghadia H, Chan V, Ganapathy S, et al. A multicentre trial of ropivacaine 7.5 mg × ml⁻¹ vs bupivacaine 5 mg × ml⁻¹ for supra clavicular brachial plexus anesthesia. *Can J Anaesth.* 1999;46:946-51 [PubMed: 10522581].
- Lydic R, Baghdoyan HA. Neurochemical mechanisms mediating opioid-induced REM sleep disruption. In: Lavigne G, Sessle BJ, Choinire M, Soja PJ, editors. *Sleep and pain.* Seattle: International Association for the Study of Pain (IASP) Press; 2007. p. 99-122.
- Bonafide CP, Aucutt-Walter N, Divittore N, et al. Remifentanyl inhibits rapid eye movement sleep but not the nocturnal melatonin surge in humans. *Anesthesiology.* 2008;108:627-33 [PubMed: 18362594].
- Bowdle TA. Nocturnal arterial oxygen desaturation and episodic airway obstruction after ambulatory surgery. *Anesth Analg.* 2004;99:70-6 [PubMed: 15281506].
- Rosenberg J, Rosenberg-Adamsen S, Kehlet H. Post-operative sleep disturbance: causes, factors and effects on outcome. *Eur J Anaesthesiol.* 1995;10:28-30 [PubMed: 7641640].
- Eisenach JC, De Kock M, Klimscha W. Alpha(2)-adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984-1995). *Anesthesiology.* 1996;85:655-74 [PubMed: 8853097].
- Murphy DB, McCartney CJ, Chan VW. Novel analgesic adjuncts for brachial plexus block: a systematic review. *Anesth Analg.* 2000;90:1122-8 [PubMed: 10781465].
- McCartney CJ, Duggan E, Apatu E. Should we add clonidine to local anesthetic for peripheral nerve blockade? A qualitative systematic review of the literature. *Reg Anesth Pain Med.* 2007;32:330-8 [PubMed: 17720118].
- Brummett CM, Norat MA, Palmisano JM, et al. Perineural administration of dexmedetomidine in combination with bupivacaine enhances sensory and motor blockade in sciatic nerve block without inducing neurotoxicity in rat. *Anesthesiology.* 2008;109:502-11 [PubMed: 18719449].
- Benoit PW, Belt WD. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaïne). *J Anat.* 1970;107:547-56 [PubMed: 5492943].
- Yagiela JA, Benoit PW, Buoncristiani RD, et al. Comparison of myotoxic effects of lidocaine with epinephrine in rats and humans. *Anesth Analg.* 1981;60:471-80 [PubMed: 7195662].
- Zink W, Graf BM. Local anesthetic myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med.* 2004;29:333-40 [PubMed: 15305253].
- Zink W, Seif C, Bohl JR, et al. The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades. *Anesth Analg.* 2003;97:1173-9 [PubMed: 14500177].
- Hebl JR. Ultrasound-guided regional anesthesia and the prevention of neurologic injury: fact or fiction? *Anesthesiology.* 2008;108:186-8 [PubMed: 18212562].
- Koff MD, Cohen JA, McIntyre JJ, et al. Severe brachial plexopathy after an ultrasound-guided single-injection nerve block for total shoulder arthroplasty in a patient with multiple sclerosis. *Anesthesiology.* 2008;108:325-8 [PubMed: 18212578].
- Horlocker TT, O'Driscoll SW, Dinapoli RP. Recurring brachial plexus neuropathy in a diabetic patient after shoulder surgery and continuous interscalene block. *Anesth Analg.* 2000;91:688-90 [PubMed: 10960400].
- Lavand'homme PM, Eisenach JC. Perioperative administration of the alpha2-adrenoceptor agonist clonidine at the site of nerve injury reduces the development of mechanical hypersensitivity and modulates local cytokine expression. *Pain.* 2003;105:247-54 [PubMed: 14499442].
- Lavand'homme PM, Ma W, De Kock M, et al. Perineural alpha(2A)-adrenoceptor activation inhibits spinal cord neuroplasticity and tactile allodynia after nerve injury. *Anesthesiology.* 2002;97:972-80 [PubMed: 12357167].
- Liu B, Eisenach JC. Perineural clonidine reduces p38 mitogen-activated protein kinase activation in sensory neurons. *Neuroreport.* 2006;17:1313-7 [PubMed: 16951576].
- Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Perineural clonidine reduces mechanical hypersensitivity and cytokine production in established nerve injury. *Anesthesiology.* 2006;104:351-5 [PubMed: 16436856].
- Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Clonidine reduces hypersensitivity and alters the balance of pro and anti-inflammatory leukocytes after local injection at the site of inflammatory neuritis. *Brain Behav Immun.* 2007;21:569-80 [PubMed: 17079113].
- Romero-Sandoval EA, McCall C, Eisenach JC. Alpha2-adrenoceptor stimulation transforms immune responses

- in neuritis and blocks neuritis-induced pain. *J Neurosci*. 2005;25:8988–94 [PubMed: 16192389].
26. Brummett CM, Norat MA, Palmisano JM, et al. Perineural administration of dexmedetomidine in combination with bupivacaine enhances sensory and motor blockade in sciatic nerve block without inducing neurotoxicity in the rat. *Anesthesiology*. 2008;109:502–11.
 27. Huseynoglu N, Ozaydin I, Yayla S, et al. Electrophysiological assessment of the effects of silicone tubes and hyaluronic acid on nerve regeneration in rats with sciatic neurotomy. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012;18:917–22.
 28. Wang H, Sorenson EJ, Spinner RJ, et al. Electrophysiologic findings and grip strength after nerve injuries in the rat forelimb. *Muscle Nerve*. 2008;38:1254–65.
 29. Dongren Y, Tao L, Fengsheng H. Electroneurophysiological studies in rats of acute dimethoate poisoning. *Toxicol Lett*. 1999;30:249–54.
 30. Shirasaka T, Kannan H, Takasaki M. Activation of a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ current and suppression of I_h contribute to dexmedetomidine-induced inhibition of rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Anesthesiology*. 2007;107:605–15 [PubMed: 17893457].
 31. Oda A, Iida H, Tanahashi S, et al. Effects of alpha2-adrenoceptor agonists on tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Anaesthesiol*. 2007;24:934–41 [PubMed: 17568475].
 32. Brummett CM, Padda AK, Amodeo FS, et al. Perineural dexmedetomidine added to ropivacaine causes a dose-dependent increase in the duration of thermal antinociception in sciatic nerve block in rat. *Anesthesiology*. 2009;111:1111–9.
 33. Sia S, Lepri A. Clonidine administered as an axillary block does not affect postoperative pain when given as the sole analgesic. *Anesth Analg*. 1999;88:1109–12 [PubMed: 10320179].
 34. Swami SS, Keniya VM, Ladi SD, et al. Comparison of dexmedetomidine and clonidine (α_2 agonist drugs) as an adjuvant to local anaesthesia in supraclavicular brachial plexus block: a randomised double-blind prospective study. *Indian J Anaesth*. 2012;56:243–9.
 35. Brummett CM, Amodeo FS, Janda AM, et al. Perineural dexmedetomidine provides an increased duration of analgesia to a thermal stimulus when compared with a systemic control in a rat sciatic nerve block. *Reg Anesth Pain Med*. 2010;35:427–31.
 36. Iskandar H, Guillaume E, Dixmerias F, et al. The enhancement of sensory blockade by clonidine selectively added to mepivacaine after midhumeral block. *Anesth Analg*. 2001;93:771–5 [PubMed: 11524354].
 37. Hung YC, Kau YC, Zizza AM, et al. Ephedrine blocks rat sciatic nerve in vivo and sodium channels in vitro. *Anesthesiology*. 2005;103:1246–52 [PubMed: 16306739].
 38. Kau YC, Hung YC, Zizza AM, et al. Efficacy of lidocaine or bupivacaine combined with ephedrine in rat sciatic nerve block. *Reg Anesth Pain Med*. 2006;31:14–8 [PubMed: 16418019].
 39. Dyhre H, Soderberg L, Bjorkman S, et al. Local anesthetics in lipid-depot formulations – neurotoxicity in relation to duration of effect in a rat model. *Reg Anesth Pain Med*. 2006;31:401–8 [PubMed: 16952810].
 40. Soderberg L, Dyhre H, Roth B, et al. Ultralong peripheral nerve block by lidocaine:prilocaine 1:1 mixture in a lipid depot formulation: comparison of in vitro, in vivo, and effect kinetics. *Anesthesiology*. 2006;104:110–21 [PubMed: 16394697].
 41. Schoeler M, Loetscher PD, Rossaint R, et al. Dexmedetomidine is neuroprotective in an in vitro model for traumatic brain injury. *BMC Neurol*. 2012;11:12–20.
 42. Sanders RD, Sun P, Patel S, et al. Dexmedetomidine provides cortical neuroprotection: impact on anaesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2010;54:710–6.
 43. Konakci S, Adanir T, Yilmaz G, et al. The efficacy and neurotoxicity of dexmedetomidine administered via the epidural route. *Eur J Anaesthesiol*. 2008;25:403–9.
 44. Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Clonidine reduces hypersensitivity and alters the balance of proand anti-inflammatory leukocytes after local injection at the site of inflammatory neuritis. *Brain Behav Immun*. 2007;21:569–80 [PubMed: 17079113].
 45. Ilfeld BM, Enneking FK. Continuous peripheral nerve blocks at home: a review. *Anesth Analg*. 2005;100:1822–33 [PubMed: 15920221].
 46. Korte N, Schenk HC, Grothe C, et al. Evaluation of periodic electrodiagnostic measurements to monitor motor recovery after different peripheral nerve lesions in the rat. *Muscle Nerve*. 2011;44:63–73.
 47. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, et al. Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005;25:508–19.