

## CAMBIOS DE EXCITABILIDAD MUSCULAR EN RATAS SOMETIDAS A SHOCK POR TORNIQUETE

Muscular excitability changes in rats under tourniquet shock

RODRIGO ITURRIAGA, HERNAN CARDENAS y LADISLAO QUEVEDO\*

### RESUMEN

Se estudiaron cronaxia, reobase y los índices de acomodación (I.A.), aplicando estímulos rectangulares y de ascenso expotencial a músculos brachioradialis de ratas controles, ratas curarizadas y ratas sometidas a cinco horas de torniquete bilaterales (5Tbi) en las extremidades posteriores. No hubo diferencias significativas en los valores de reobase, I.A. y cronaxia obtenidos en ratas curarizadas con respecto a los controles. Se obtuvieron valores similares de reobase y cronaxia entre ratas 5Tbi y las ratas controles.

A la hora de retirar los torniquetes los I.A. musculares presentaron un aumento altamente significativo ( $p < 0.001$ ) con respecto a los controles, alcanzando su máximo valor a las dos horas. A partir de este tiempo este aumento se mantuvo durante el resto de los experimentos.

### ABSTRACT

The reobase, chronaxie and muscular accommodation indexes (I.A.) were studied. These experiments were made by applying rectangular and exponential rising current to brachioradialis muscles of control rats, curarized rats submitted to five hours of bilateral hind limb tourniquet. There were not significant differences in the values of chronaxie, reobase and I.A. of the curarized rats relative to the control group.

Rats submitted to five hours of bilateral hind limb tourniquet showed similar values of chronaxie and reobase.

An hour after tourniquet release, the muscular I.A. showed a highly significant increase ( $p < 0.001$ ) relative to the control group, reaching their maximum values at two hours. These high values of the muscular A.I. were kept throughout the rest of the time course of the experiments.

Keywords: Muscular physiology. Shock reactions.

\*Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción. Casilla 2407, Apartado 10. Concepción, Chile. Financiado por Proyecto D.I. de la Universidad de Concepción N° 20.33.02.

## INTRODUCCION

Existen diferentes métodos experimentales para producir shock en animales de laboratorio, entre estos hemos escogido el modelo de shock por torniquete descrito por Rosenthal (1943), en el cual el tiempo de aplicación de las ligaduras determina el porcentaje de mortalidad. Con una o dos horas de aplicación la mortalidad es de 0% y con cinco horas de aplicación de las ligaduras la mortalidad aumenta al 100% en la rata, Sáez (1981).

Después de retirar a las ligaduras en la rata se ha encontrado un aumento significativo de la potasemia y del hematocrito Rosenthal et al. (1954), disminución del flujo sanguíneo total y aumento de la resistencia periférica total (Takács et al. 1962). En músculos de rata sometidos a isquemia por torniquete se describió un aumento de la permeabilidad de las membranas a enzimas (Sáez et al. 1982), a potasio, sodio y agua (Rosenthal 1954). Los cambios en las concentraciones iónicas e ingreso de agua se deben a alteraciones en las propiedades de las membranas y no solamente ocurren en áreas injuriadas primariamente por la isquemia, sino que se encuentran en zonas distantes como resultado de la hipoxia producida por la reducción del flujo sanguíneo (Levenson et al. 1961).

En las membranas de conducción es donde se manifiestan a menudo cambios prematuros debido a alteraciones en la homeostasis, lo cual puede conducir a variaciones en parámetros de excitabilidad. Entre éstos la acomodación ha resultado ser la más sensible a alteraciones patológicas y farmacológicas de las membranas excitables (Aguayo et al. 1981); (Quevedo et al. 1978) y Vivaldi et al. (1965). Acomodación se define como el aumento de umbral al ser estimuladas las membranas con corrientes de larga duración y ascenso lento (Quevedo et al. 1978).

Los valores de acomodación en fibras miélicas de *Xenopus laevis* han sido relacionados con modificaciones en los mecanismos de inactivación de la conductancia del sodio (Frankenhaeuser et al. 1965).

En animales en shock, el registro de potenciales de membrana de fibras musculares ha sido usado como un método directo para evaluar cambios del estado funcional de las células musculares, encontrándose disminución progresiva de los potenciales de membrana durante el curso del shock (Jennische et al. 1978). En motoneuronas de ratas ha sido relacionado aumento de valores de acomodación con reducción del flujo sanguíneo y con disminución de los potenciales de membrana (Bradley et al. 1961).

El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios de excitabilidad en músculos brachioradialis en ratas después de haber sido sometidas a cinco horas de torniquetes bilaterales en las extremidades posteriores.

### MATERIALES Y METODOS

En los experimentos se usaron ratas albinas Sprague-Dawle de ambos sexos que pesaron entre 250–350 g. En las manipulaciones quirúrgicas y en las medidas electrofisiológicas los animales fueron anestesiados con éter etílico. Al comienzo de los experimentos se administró por vía intramuscular Ampicilina (100 m/g kg), que se repitió cada seis horas para prevenir bacteremia. Durante el curso de los experimentos no se suministró agua ni alimentos a las ratas. La temperatura ambiental se mantuvo entre 20–24°C.

#### 1.- METODO EXPERIMENTAL PARA PRODUCIR SHOCK.

Se colocaron torniquetes en las dos extremidades posteriores, los cuales fueron retirados después de cinco horas. Las ligaduras se hicieron de bandas de caucho de 1 cm de ancho por 1–2 mm de grosor que se aplicaron bajo la piel en la región de las articulaciones coxo-femoralis.

#### 2. MEDICIONES ELECTROFISIOLOGICAS EN MUSCULOS BRACHIORADIALIS

Las medidas de rebase, cronaxia fueron realizadas en músculos brachioradialis, practicándose en la piel una incisión de 1–2 cm de largo, para exponer los músculos. Se retiró parte del tejido conjuntivo y facie que cubre los músculos, humectándolos con Tyrode a pH 7.35 y a 37°C antes de efectuar las medidas.

Con el objeto de determinar si la respuesta muscular era causada por estimulación directa de las fibras musculares o a través de puntos motores, se estudiaron los mismos parámetros de excitabilidad en ratas curarizadas con cloruro de d-tubocurarina (2mg/kg). En estos casos la respiración fue mantenida conectando a la traquea de los animales una bomba de respiración artificial V 5 kg Narco Biosystem. La frecuencia cardiaca se controló en un Audio Monitor Grass AM 7. La temperatura rectal fue medida periódicamente y se mantuvo a 37°C con ayuda de una fuente calórica.

#### 3.- ACOMODACION

Para medir acomodación se usaron electrodos bipolares colocados sobre la superficie de los músculos, usando pulsos rectangulares reobásicos y de ascenso exponencial, con frecuencia de un pulso por segundo.

La mínima contracción muscular visible fue tomada como respuesta umbral. Los resultados obtenidos con este método son consistentes con los obtenidos al registrar la respuesta con electromiografía. Los pulsos rectangulares fueron generados por un estimulador Grass S<sub>44</sub> conectado a una unidad de aislación Grass SIU5 A. Los pulsos de ascenso exponencial fueron obtenidos al conectar el sistema de estimulación con un circuito desistivo-capacitativo (RC) en serie, obteniendo constantes de tiempo de 20, 40, 60 y 80 ms.

Los resultados son expresados como índices de acomodación (I.A.) según Gunther et al. (1965), y Quevedo et al. (1978), y fueron medidos en ratas controles y curarizadas y en ratas con 5 horas de torniquete (5Tbi) durante el tiempo en que las ligaduras estuvieron colocadas y hasta doce horas después de retirarlas. Los resultados obtenidos en los grupos experimentales se contrastaron con los del grupo control con el test t de Student.



## RESULTADOS

## 1.- MEDIDAS ELECTROFISIOLOGICAS EN RATAS CURARIZADAS.

Los valores de umbrales reobásicos y cronaxia obtenidos en ratas curarizadas con respecto a los controles, no presentaron diferencias significativas. Los valores de los I.A. son similares en ratas curarizadas y en controles. Las curvas de acomodación exhiben en ambos casos un cambio de pendiente en la constante de tiempo de 40ms.

## 2.- REOBASE, CRONAXIA EN RATAS EN SHOCK

Los valores de los parámetros de excitabilidad, medidos en músculos brachioradialis, de cronaxia y reobase no fueron estadísticamente, diferentes en los animales del grupo experimental con respecto a los controles, en ambos casos la reobase presentó valores entre 2-3 volt y los valores de cronaxia oscilaron entre 0.05-0.12 ms.

## 3.- ACOMODACION EN MUSCULOS BRACHIORADIALIS DE RATAS EN SHOCK

Las medidas de acomodación realizadas antes de retirar los torniquetes muestran valores de los I.A. similares a los controles (Fig. 1). Un aumento altamente significativo ( $p < 0.001$ ) fue encontrado desde la primera hora después de retirar los torniquetes en todos los índices estudiados (Fig. 2, Tabla 1).

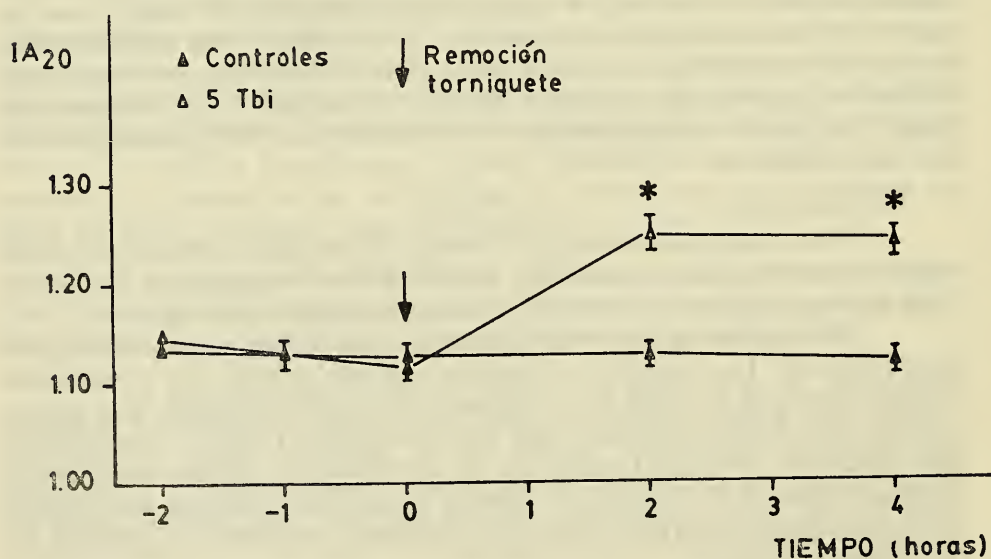


Fig. 1.- Comportamiento del índice de acomodación al aplicar corriente exponencial de 20 ms de constante de tiempo (I.A. 20) antes y después de retirar los torniquetes. Los tiempos negativos corresponden a medidas realizadas antes de retirar los torniquetes. 5Tbi indica que las ratas fueron sometidas a 5 horas de torniquete bilateral de sus extremidades posteriores. Los valores graficados representan en esta figura y en las siguientes los valores promedio y el error standard (\* $p < 0.001$ ).

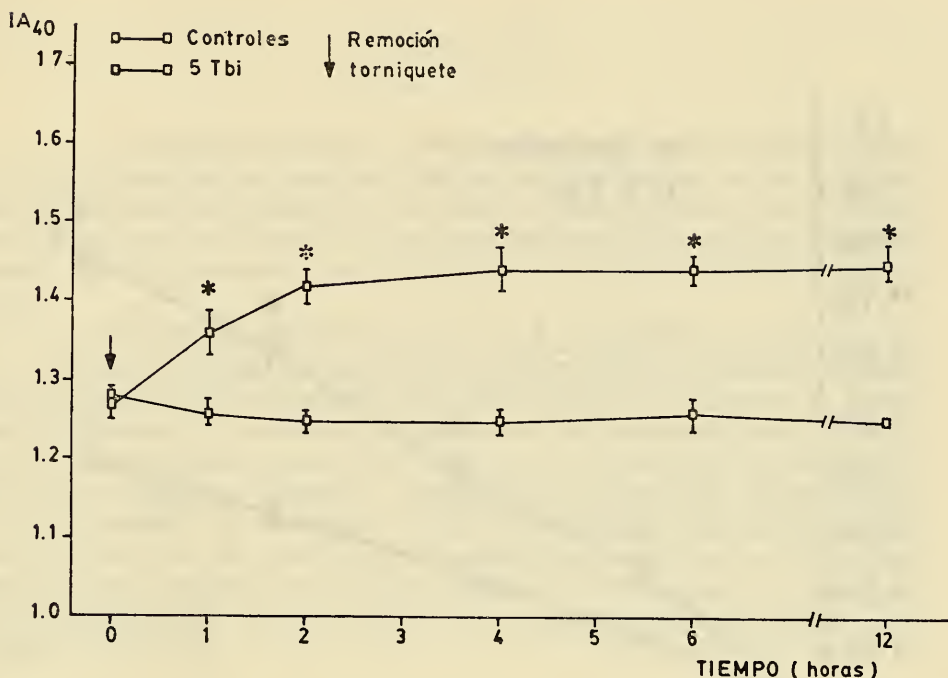


Fig. 2.- Comportamiento del I.A.<sub>40</sub> en el tiempo, después de retirar los torniquetes. Se observó un aumento altamente significativo ( $p < 0.001$ ) del índice de acomodación muscular I.A.<sub>40</sub> desde una hora después de retirar las ligaduras, este aumento llega a su máximo valor a las dos horas y permanece alto las doce horas del registro ( $*p < 0.001$ ), 5Tbi indica valores de I.A. obtenidos en ratas sometidas a 5 horas de torniquete.

TABLE I.

VALORES DE LOS INDICES DE ACOMODACION MUSCULAR I.A.<sub>20</sub> E I.A.<sub>60</sub> MEDIDOS EN RATAS SOMETIDAS A CINCO HORAS DE TORNIQUETE.

		Tiempo de medida después de retirar los torniquetes (horas)			
		0	1	2	6
I.A. <sub>20</sub>	Control	1.14 ± 0.01(13)	1.13 ± 0.01(13)	1.13 ± 0.01(13)	1.12 ± 0.02(13)
	Torniquete	1.14 ± 0.02(22)	1.17 ± 0.01(22)	1.21 ± 0.02(18)	1.22 ± 0.01(16)
		N. S.	*	*	*
I.A. <sub>60</sub>	Control	1.36 ± 0.01(13)	1.35 ± 0.01(13)	1.34 ± 0.02(13)	1.35 ± 0.02(13)
	Torniquete	1.36 ± 0.02(22)	1.54 ± 0.03(22)	1.62 ± 0.04(18)	1.64 ± 0.04(18)
		N. S.	*	*	*

(n): Número de músculos medidos.

\*: Probabilidad altamente significativa ( $p < 0.001$ ).

N.S.: Probabilidad no significativa ( $p > 0.05$ ).

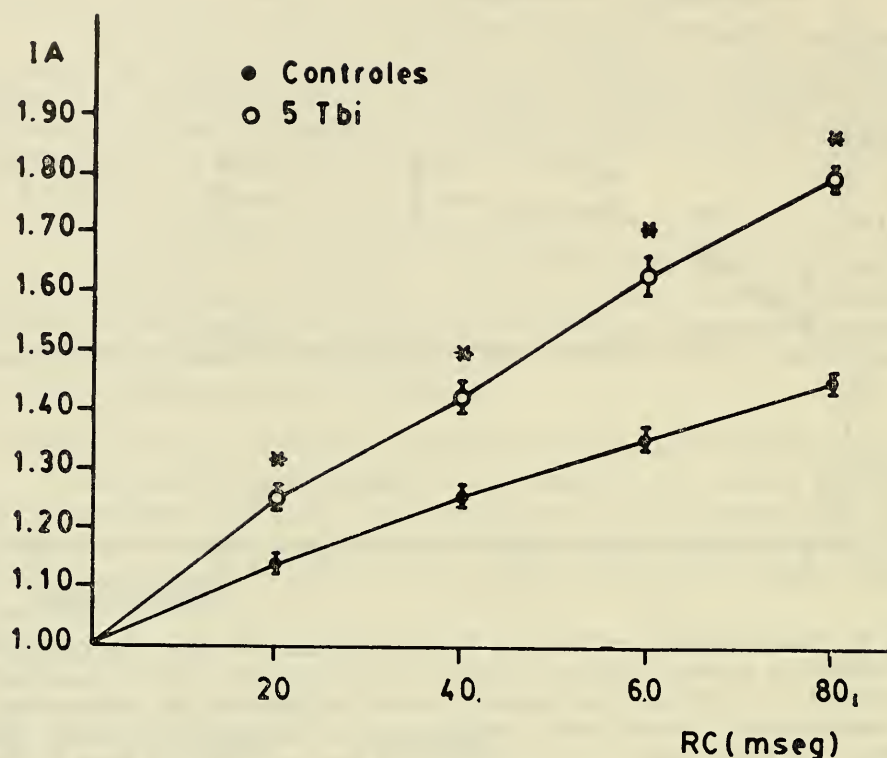


Fig. 3.- Curva de acomodación en ratas en shock. Curvas de acomodación muscular de ratas controles y ratas sometidas a cinco horas de torniquete bilateral (5Tbi). Los valores corresponden a las medidas obtenidas cuatro horas después de retirar los torniquetes. Ordenada: I.A. Abcisa: constantes de tiempo en ms. (\* $p < 0.001$ ).

Este aumento alcanza a la segunda hora su máximo valor para estabilizarse y permanecer constante durante el curso de los experimentos (12 hrs.).

Los valores de los índices de acomodación I.A.<sub>20</sub> ea I.A.<sub>60</sub>, para el grupo experimental y el grupo control se muestran en la Tabla I; los valores obtenidos para I.A.<sub>40</sub> en el grupo experimental y control se ilustra en la Fig. 2.

La Fig. 3 ilustra la curva de acomodación obtenida cuatro horas después de retirar los torniquetes, esta curva se compara con la curva control obtenida a las cuatro horas. Se puede observar una ligera quebradura de la curva de acomodación a los 40 ms en los valores controles y a los 20 ms en la curva de acomodación en las ratas sometidas a torniquete.

### DISCUSION

Los resultados obtenidos al estimular los músculos brachioradialis de ratas curarizadas no muestran diferencias significativas en los I.A., reobase y cronaxia con respecto a los valores encontrados en los controles. Esto permite suponer que las respuestas observadas corresponden a acomodación muscular obtenida por estimulación directa de las fibras musculares.

El aumento significativo de los I.A. encontrado a partir de una hora después de retirar los torniquetes (Tabla I, Fig. 2) permite suponer que las membranas musculares se alteran durante el síndrome de shock. Los mecanismos de inactivación del sodio son afectados por pequeñas depolarizaciones, que causan incrementos en acomodación (Frankenhaeuser et al. 1965), sin embargo, aunque hemos detectado disminuciones en los potenciales de membrana de las fibras de músculos brachioradialis dos horas después de retirar los torniquetes, otros factores no se pueden descartar para explicar el aumento observado. En efecto, la reducción del flujo sanguíneo ha sido asociado con aumentos en acomodación por Bradley et al. 1961.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos al estimular músculos brachioradialis de ratas muestran:

1. Valores de excitabilidad y acomodación similares en ratas curarizadas y en controles, que permiten postular que las respuestas se obtuvieron por estimulación de las fibras musculares.
2. Valores de cronaxia y reobase similares en ratas en shock por torniquete y en el grupo control.
3. Aumento altamente significativo ( $p < 0.001$ ) en los I.A. musculares a partir de una hora después de retirar los torniquetes, este aumento alcanza su valor máximo a las dos horas y se estabiliza.

### AGRADECIMIENTOS

Debemos expresar nuestros agradecimientos al Sr. Julio Vargas A., Laborante del Departamento de Ciencias Fisiológicas por su cooperación y asistencia técnica en la elaboración de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por Proyecto 20.33.02 de la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción.



## BIBLIOGRAFIA

- Aguayo, L., L. Quevedo, J. Concha y M. Silva, 1981. Cambios Electrofisiológicos en nervio ciático de *Pleurodema thaul* por acción del 3-0 Metil Galato. Bol. Soc. Biol. de Concepción. 51: 41-46.
- Bradley, K. y G. Somjen, 1961. Accommodation in Motoneurons of cats and rats. J. Physiol. (London). 156: 75-94.
- Frankenhaeuser, B. y A. B. Vallbo, 1965. Accommodation in Myelinated Nerve Fibers of *Xenopus laevis* as computed on the basis of voltage clamp data. Acta Physiol. Scand. 63: 1-20.
- Gunther, B., J. Concha y F. Roedel, 1949. Un nuevo método de electrodiagnóstico dental. Bol. Soc. Biol. Concepción. 24: 70.
- Jennische, E., A. Medegard y H. Haljamae, 1978. Transmembrane Potential changes as an indicator of cellular metabolic deterioration in skeletal muscle during shock. Eur. Sur. Res. 10: 125-133.
- Levenson, S. M., A. Einheben y O. J. Malm, 1961. Nutricional and Metabolic aspects of shock. Fed. Proc. 20(2) Suppl. 9: 99-119.
- Quevedo, L., J. Baldeig, J. Concha e I. Benoit, 1978. Accommodation related to the action of Ethanol on Frog Sciatic Nerve. Pharmacology. 17: 249-253.
- Rosenthal, S. W., 1943. Experimental chemotherapy of burs and shock: IV Production of traumatic shock in mice. Public Health. 58: 1428-1436.
- Rosenthal, S. M. y R. C. Millian, 1954. The role of fluids, electrolytes and plasma proteins in experimental traumatic shock and hemorrhage. Pharmacol. Rev. 6: 489-520.
- Sáez, J. C., 1981. Shock por torniquete en rata. Archivos de Biología y Medicina Experimental. 14(3): 295.
- Sáez, J. C., E. Vivaldi y B. Gunther, 1982. Tourniquet Shock in rats; Appearance of Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Serum. IRCS Medical Science. 10: 191-192.
- Takás, L., K. Kálmán y J. Skolnic, 1962. Effects of tourniquet shock and acute hemorrhage on the circulation of various organs in the rat. Cir. Research. 10: 753-757.
- Vivaldi, L. y L. Quevedo, 1965. Quebradura de la curva de acomodación en Nervios Pulpares. Anales Españoles de Odontología. 24(2): 105-119.