

Nociceptive evaluation of the association between physical exercises and platelet-rich fibrin in Wistar rats submitted to median nerve compression

Avaliação nociceptiva da associação entre exercício físico e fibrina rica em plaquetas em ratos Wistar submetidos ao modelo de compressão de nervo mediano

Jhenifer Karvat¹, Camila Mayumi Martin Kakihata¹, Ana Luiza Peretti¹, Giovanni Ribeiro Bernardino¹, José Luis da Conceição Silva², Gladson Ricardo Flor Bertolini³

DOI 10.5935/1806-0013.20160028

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Platelet-rich fibrin is a new and promising technique to accelerate repair, with possible analgesic effects; however, there is still a gap with regard to peripheral nerve injury and the association with physical exercises. So, this study aimed at evaluating the effects of platelet-rich fibrin associated to physical exercises on nociception and edema in experimental median nerve compression model.

METHODS: Thirty-six rats, all submitted to median nerve compression, were divided in six groups: G1: without additional manipulation; G2: compression and treated with platelet-rich fibrin; G3: compression and treated with free swimming; G4: compression and walking on a treadmill; G5: free swimming + platelet-rich fibrin; G6: walking on a treadmill + platelet-rich fibrin. Injury was induced by tying the median nerve with chrome plated catgut 4.0. Platelet-rich fibrin was obtained by centrifuging 1.5 mL of blood and positioning the fibrin clot directly on the compression region. Exercises were carried out during two weeks, between the 3rd and 14th postoperative days. Nociception and edema were evaluated, respectively, by flinch threshold and plethysmometer, in moments before injury and in the 3rd, 7th and 15th postoperative days.

RESULTS: There have been no differences among groups, only among evaluations, showing increased nociception and edema, which has lasted or improved, respectively, over time.

CONCLUSION: Platelet-rich fibrin alone or associated to physical exercises has not changed nociception and edema.

Keywords: Edema, Exercise therapy, Inflammation, Pain measurement.

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Fibrina rica em plaquetas é uma técnica nova e promissora na aceleração do reparo, com possíveis efeitos analgésicos, contudo, ainda há uma lacuna com relação à lesão nervosa periférica, bem como com a associação com exercícios físicos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fibrina rica em plaquetas associada a exercício físico sobre a nociceção e o edema, em modelo experimental de compressão do nervo mediano.

MÉTODOS: Foram utilizados 36 ratos, todos submetidos a compressão do nervo mediano e divididos em seis grupos: G1: sem manipulações adicionais; G2: compressão e tratado com fibrina rica em plaquetas; G3: compressão e tratado com natação livre; G4: compressão e exercício de caminhada em esteira; G5: natação livre + fibrina rica em plaquetas; G6: caminhada em esteira + fibrina rica em plaquetas. O modelo de lesão foi realizado com amarração do nervo mediano, com fio catgut 4.0 cromado. Para obtenção da fibrina rica em plaquetas, 1,5mL de sangue foi centrifugado e o coágulo de fibrina foi posicionado diretamente sobre a região da compressão. Os protocolos de exercício foram realizados durante 2 semanas, entre o 3º e 14º dias de pós-operatório. As avaliações nociceptivas e de edema ocorreram, respectivamente, pelo limiar de retirada de pata e pletismometria, nos momentos prévios à lesão, no 3º, 7º e 15º dias de pós-operatório.

RESULTADOS: Não houve diferenças entre os grupos, apenas entre as avaliações, denotando que houve aumento da nociceção e do edema, o qual perdurou ou foi decaindo, respectivamente, com o passar do tempo.

CONCLUSÃO: O uso isolado ou associado da fibrina rica em plaquetas com exercícios físicos não produziu alterações na nociceção e edema.

Descritores: Edema, Inflamação, Mensuração da dor, Terapia por exercício.

INTRODUÇÃO

As plaquetas desempenham um papel crítico na regulação da angiogênese, pois são responsáveis pela ativação e liberação de citocinas e fatores de crescimento que induzem proliferação e ativação celular¹. Além disso, concentrados plaquetários têm sido utilizados para acelerar o reparo tissular por conta do alto conteúdo de fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), de fator de crescimento transformante beta (TGF-β), de fator de crescimento insulínico

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Departamento de Fisioterapia, Cascavel, PR, Brasil.

2. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Cascavel, PR, Brasil.

3. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação de Biociências e Saúde, Cascavel, PR, Brasil.

Apresentado em 17 de dezembro de 2015.

Aceito para publicação em 30 de março de 2016.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Endereço para correspondência:

Gladson Ricardo Flor Bertolini
Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário
85819-110 Cascavel, PR, Brasil.
E-mail: gladson_ricardo@yahoo.com.br

(IGF) e de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)².

A fibrina rica em plaquetas (FRP) é um biomaterial novo, autógeno podendo causar angiogênese, controle imune e aumento de células mesenquimais circulantes³. Ainda apresenta grande potencial para uso rotineiro na redução da dor e desconforto pós-operatórios (PO), sendo utilizada tanto para o reparo de tecidos ósseos quanto de tecidos moles⁴. Além disso, a FRP é fácil de usar e apresenta baixo custo. Existem controvérsias, entretanto, a respeito de seus resultados^{5,6}, visto que há escassez de evidências acerca do tamanho de seus benefícios⁴, como por exemplo em casos de neuropatias periféricas. A neuropatia compressiva mais comum na extremidade superior é a síndrome do túnel do carpo (STC). Tal condição é responsável por custos substanciais para a sociedade, em termos de perda da capacidade produtiva do indivíduo e custos de tratamento⁷. STC é uma condição que afeta milhões de indivíduos, causando dor crônica, sensibilidade alterada e atrofia tenar⁸.

Para a STC, a primeira opção de tratamento é o conservador, quando podem ser utilizados órteses, esteroide local e oral, além de recursos fisioterapêuticos, como exercícios físicos⁷. Existem indícios que a analgesia induzida pelo exercício seja decorrente, tanto da elevação do limiar de dor quanto do aumento do nível de opioides endógenos no sangue⁹.

Visto que são necessárias novas terapêuticas para o tratamento de neuropatias periféricas, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos sobre a nocicepção e o edema da FRP associada a exercício físico em modelo experimental de compressão do nervo mediano.

MÉTODOS

Foram utilizados 36 ratos *Wistar*, machos, com peso médio de 363,4±59,6g, e idade 12±2 semanas, mantidos em fotoperíodo de 12h, 24±1 °C, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em seis grupos, conforme o tratamento utilizado:

G1 (n=8) – submetido à compressão nervosa;

G2 (n=8) – compressão nervosa + FRP;

G3 (n=8) – compressão nervosa e natação livre;

G4 (n=8) – compressão nervosa e exercício de caminhada em esteira;

G5 (n=8) – compressão nervosa e natação livre + FRP;

G6 (n=8) – compressão nervosa e exercício de caminhada em esteira + FRP.

Protocolo de compressão do nervo mediano

Para realizar a compressão do nervo mediano, foi utilizado um modelo de amarra com fio Catgut 4.0 cromado, em 4 pontos, com distância aproximada de 1 mm, no nervo mediano, na região proximal ao cotovelo direito¹⁰. Para realizar o procedimento cirúrgico de compressão do nervo mediano, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (85mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg).

O modelo gera no animal sintomas dolorosos e diminuição da função motora, que se iniciam por volta do 3º dia e têm aumento da nocicepção por volta do 7º dia.

Protocolo para obtenção da fibrina rica em plaquetas

Para a preparação da FRP, foi retirado 1,5mL de sangue, via pun-

ção cardíaca, de cada animal¹¹, que é um volume seguro segundo recomendação de Ehrenfest et al.¹². Imediatamente após a retirada do sangue a amostra foi colocada em tubos estéreis (sem anticoagulante) tipo *eppendorf* para centrifugação, em 3000rpm, com força de aproximadamente 400G, durante 10 minutos. A FRP foi retirada da camada média da amostra centrifugada, entre a parte vermelha (abaixo) e o plasma (acima). O coágulo de fibrina foi posicionado, então, diretamente sobre o nervo mediano, na região da compressão, para os animais do G2, G5 e G6.

Protocolo de natação

Uma das formas utilizadas como tratamento dos animais foi a natação de baixa intensidade, sem sobrecarga. Para a realização desse protocolo, os animais foram colocados em um tanque de água, com capacidade para 200L, com profundidade de 60cm, e temperatura da água entre 30 e 32º C. Os animais, do G3 e G5, receberam o estresse de natação cinco dias antes da realização da cirurgia (como forma de habituação), interrompendo logo após o procedimento cirúrgico, reiniciando a partir do 3º até o 14º dia de PO de compressão do mediano, totalizando 12 dias de terapia. Tanto durante o treinamento, quanto durante o período de natação o tempo foi de 10 minutos/dia.

Protocolo de caminhada em esteira

Outra forma de tratamento foi a caminhada em esteira elétrica, adaptada para ratos, com velocidade de 10m/min, por 10 minutos/dia para o G4 e o G6. E, de forma semelhante ao da natação, também foi realizado em um período de cinco dias de treinamento, prévio ao procedimento de compressão nervosa, e então novamente do 3º ao 14º PO.

Avaliação da nocicepção pelo limiar de retirada

A nocicepção foi avaliada pelo limiar de retirada do membro ao estímulo mecânico. O equipamento utilizado para realizar o teste de sensibilidade dolorosa foi o analgesímetro digital, tipo Von Frey, da marca Insight[®]. O equipamento consiste em um braço transdutor, com uma ponteira de polipropileno descartável, com capacidade de 0,1 a 1000g ligado a uma caixa amplificadora, medindo a pressão realizada sobre a superfície do animal.

Os animais foram contidos manualmente e o filamento aplicado em duas regiões: na região da compressão nervosa e na palmar. A ponta de polipropileno foi aplicada perpendicularmente à área, com gradual aumento de pressão, e logo que o animal retirou o membro anterior direito, o teste foi interrompido para o registro do limiar de retirada. Houve um tempo de adaptação e treino dos animais de três dias. Sendo que as avaliações ocorreram previamente à lesão (AV1) e ao início do tratamento (3º PO – AV2), no 7º (AV3) e 15º (um dia após o final das formas de terapia – AV4) PO.

Avaliação do edema

Foi avaliada na região distal da compressão (distal ao punho) a formação de edema, o qual pode influenciar a evolução clínica do animal. Para tal fim, utilizou-se um pletismômetro (Insight[®]), sempre após a avaliação do limiar de retirada, nos mesmos dias. Ao 15º dia PO, findas as avaliações, os animais foram eutanasiados.

Análise estatística

Os resultados foram expressos e analisados por meio da estatística descritiva e inferencial. Foi analisada a normalidade dos dados, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, e posteriormente foi utilizado a Análise de Variância misto, visando a diminuir a possibilidade de erros tipo II por excesso de testes; em todos os casos o nível de significância foi de 5%.

O projeto foi conduzido segundo as normas internacionais de ética em experimentação animal, e aprovado para realização pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e Aulas Práticas da entidade, sob protocolo número 05612 de 2012.

RESULTADOS

Observou-se que para a avaliação realizada da nocicepção, no local da compressão nervosa, houve diferenças significativas ($F(2,3; 69,8)=49,8$, $p<0,001$). As diferenças não ocorreram entre os grupos ($p>0,05$), mas sim entre as avaliações, sendo que AV1 foi maior do que as seguintes ($p<0,001$), bem como AV4 foi significativamente maior do que AV2 ($p=0,038$) e AV3 ($p=0,002$) (Tabela. 1).

Na a avaliação nociceptiva, na região palmar, também houve diferenças significativas ($F(1,9; 55,9)=14,1$, $p<0,001$). De forma semelhante ao observado na região da compressão, as diferenças não ocorreram entre os grupos ($p>0,05$), mas sim entre as avaliações, sendo que AV1 foi maior do que as seguintes ($p<0,001$) (Tabela 2). Com relação à avaliação realizada do edema houve diferenças significativas ($F(3; 90)=11,3$, $p<0,001$). Novamente, não houve diferenças entre os grupos ($p>0,05$), mas sim entre as avaliações, sendo que AV1 foi menor do AV2 ($p=0,005$), e AV2 foi maior do que AV3 ($p=0,003$) e AV4 ($p<0,001$) (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A FRP tem sido estudada e utilizada principalmente no campo odontológico, visto os efeitos na aceleração de reparo pela liberação de fatores de crescimento¹³, e também por apresentar fácil manuseio e preparo¹⁴. No presente estudo buscou-se abordar outras formas de seu uso, como lesões nervosas periféricas, contudo independentemente do grupo, o uso isolado ou associado da FRP com com exercícios físicos não produziu alterações na nocicepção e edema. Ausência de resultados positivos também foi observada em estudo que avaliou a FRP visando a cobertura de recessos gengivais na região central da mandíbula em 10 voluntários¹⁵. Fato também observado com relação à ineficácia na regeneração óssea de indivíduos com periodontite crônica¹⁶. Já outros autores relatam que a FRP foi eficaz na regeneração óssea em pacientes com defeitos ósseos intraorais após enucleação cística¹⁷.

Em trabalho utilizando a FRP associada ou não à cerâmica no reparo ósseo de calvária de coelhos, os autores relataram que a FRP tem um efeito positivo sobre a formação óssea quando usada sozinha ou em combinação². Já outros autores buscando avaliar os efeitos da FRP na regeneração da inserção de manguito rotador de ratos submetidos à tenotomia bilateral e reparo do supraespinhoso, observaram que houve maior força tênsil nos animais submetidos à FRP. A característica do reparo, entretanto, foi compatível com tecido cicatricial fibrovascular, sugerindo um possível efeito inibitório da cura do manguito rotador¹⁸. Estudo avaliando o uso da FRP em cavidades decorrentes da extração de terceiro molar constatou que não houve diferenças no reparo do tecido ósseo, contudo, a redução da dor pode sugerir reparo de tecidos moles⁴. Porém, outro trabalho, também realizado com extração de terceiros molares, indicou

Tabela 1. Média e desvio padrão do limiar de retirada do membro, quando a pressão (gf) ocorreu no local da compressão nervosa

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
AV1	192,5±89,9	267,7±91,7	299,3±66,1	252,6±117,3	287,7±51,3	239,9±62,4
AV2 [#]	124,8±27,5	117,0±56,6	104,8±29,3	109,0±22,5	119,3±32,1	153,9±33,1
AV3 [#]	106,7±43,0	118,3±65,3	108,0±47,3	114,7±52,4	143,5±66,4	127,7±52,0
AV4 [*]	116,2±70,8	167,5±119,0	155,5±90,2	193,8±138,0	173,5±93,3	193,4±115,0

* Diferença significativa ao comparar com AV1. # Diferença significativa ao comparar com AV4.

Tabela 2. Média e desvio padrão, do limiar de retirada do membro, quando a pressão (gf) ocorreu na região palmar

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
AV1	188,6±65,8	243,2±55,2	255,6±44,8	278,5±43,1	308,4±43,5	252,0±44,2
AV2 [*]	235,5±70,9	175,4±44,7	203,9±59,9	205,8±30,2	154,8±30,5	202,7±52,1
AV3 [*]	181,4±29,8	175,0±47,5	175,7±18,9	178,7±28,4	164,4±27,1	164,4±40,5
AV4 [*]	176,2±51,0	189,9±106,5	184,9±92,9	162,7±80,8	161,3±47,7	208,0±88,1

* Diferença significativa ao comparar com AV1.

Tabela 3. Média e desvio padrão do edema do membro, por pletismometria (mL)

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
AV1	1,56±0,30	1,66±0,26	1,47±0,24	1,34±0,24	1,39±0,46	1,29±0,21
AV2 [*]	1,77±0,23	1,93±0,33	1,81±0,34	1,93±0,61	1,50±0,41	1,73±0,25
AV3 [#]	1,60±0,57	1,39±0,43	1,56±0,13	1,33±0,25	1,32±0,54	1,39±0,35
AV4 [#]	1,36±0,16	1,43±0,36	1,47±0,09	1,39±0,08	1,08±0,48	1,22±0,20

* Diferença significativa ao comparar com AV1. # Diferença significativa ao comparar com AV2.

melhora no edema, sem, contudo, redução da intensidade da dor¹⁹. Embora as médias de retirada do membro obtidas por G1 tenham sido menores do que as encontradas nos outros grupos, a análise estatística apontou inexistência de diferenças entre os grupos, apenas entre as avaliações.

Surtem diversas limitações do presente estudo, como por exemplo, a utilização da fração intermediária da FRP, que pode não apresentar a maior quantidade de fatores de crescimento disponíveis²⁰; o tempo de centrifugação pode ter sido curto para potencializar a liberação de fatores de crescimento, conforme demonstrado em estudo recente que apontou vantagens de centrifugar por 12 minutos frente a 10 minutos²¹, além da avaliação de apenas dois sinais do processo de inflamação/reparo. Ainda, salienta-se que o uso de FRP, associada ou não a outras modalidades, ainda é uma técnica nova, com estudos *in vitro*²² e *in vivo*¹⁵⁻¹⁷ apresentando resultados contraditórios, necessitando assim de continuidade de experimentos com relação aos seus efeitos.

CONCLUSÃO

O uso isolado ou associado da FRP com exercícios físicos não produziu alterações na nocicepção e no edema, no modelo de compressão de nervo mediano.

REFERÊNCIAS

- Martínez CE, Smith PC, Palma Alvarado VA. The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update. *Front Physiol.* 2015;6:290.
- Acar AH, Youlcu Ü, Gül M, Keles A, Erdem NF, Altundag Kahraman A. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol.* 2015;60(4):606-14.
- Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e56-60.
- Kumar YR, Mohanty S, Verma M, Kaur RR, Bhatia P, Kumar VR, et al. Platelet-rich fibrin: the benefits. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015;54(1):57-61.
- Moraschini V, Barboza Edos S. Use of platelet-rich fibrin membrane in the treatment of gingival recession: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2016;87(3):281-90.
- di Lauro AE, Abbate D, Dell'Angelo B, Iannaccone GA, Scotto F, Sammartino G. Soft tissue regeneration using leukocyte-platelet rich fibrin after exeresis of hyperplastic gingival lesions: two case reports. *J Med Case Rep.* 2015;9:252.
- Bickel KD. Carpal tunnel syndrome. *J Hand Surg.* 2010;35(1):147-52.
- Gupta R, Rowshan K, Chao T, Mozaffar T, Steward O. Chronic nerve compression induces local demyelination and remyelination in a rat model of carpal tunnel syndrome. *Exp Neurol.* 2004;187(2):500-8.
- Koltyn KF. Analgesia following exercise. A review. *Sport Med.* 2000;29(2):85-98.
- Chen JJ, Lue JH, Lin LH, Huang CT, Chiang RP, Chen CL, et al. Effects of pre-emptive drug treatment on astrocyte activation in the cuneate nucleus following rat median nerve injury. *Pain.* 2010;148(1):158-66.
- Ding XG, Li SW, Zheng XM, Hu LQ, Hu WL, Luo Y. The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. *Asian J Androl.* 2009;11(2):215-21.
- Ehrenfest DM, Lemo N, Jimbo R, Sammartino G. Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): rabbit tricks and traps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(4):413-6.
- Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016. Epub ahead of print.
- Khorshidi H, Raoofi S, Bagheri R, Banihashemi H. Comparison of the mechanical properties of early leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin versus PRGF/Endoret membranes. *Int J Dent.* 2016: 1849207.
- Rajaram V, Thyegarajan R, Balachandran A, Aari G, Kanakamedala A. Platelet Rich Fibrin in double lateral sliding bridge flap procedure for gingival recession coverage: an original study. *J Indian Soc Periodontol.* 2015;19(6):665-70.
- Gamal AY, Ghaffar KAA, Algezhwy OA. Crevicular fluid growth factors release profile following the use of Platelets Rich Fibrin (PRF) and Plasma Rich Growth Factors (PRGF) in treating periodontal intrabony defects (randomized clinical trial). *J Periodontol.* 2016. [Epub ahead of print].
- Meshram V, Lambade P, Meshram P, Kadu A, Tiwari M. The autologous platelet rich fibrin: A novel approach in osseous regeneration after cystic enucleation: A pilot study. *Indian J Dent Res.* 2015;26(6):560-4.
- Hasan S, Weinberg M, Khatib O, Jazrawi L, Strauss EJ. The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff healing in a rat model. *Int J Sport Med.* 2016;37(1):36-42.
- Ozgul O, Senses F, Er N, Tekin U, Tuz HH, Alkan A, et al. Efficacy of platelet rich fibrin in the reduction of the pain and swelling after impacted third molar surgery: randomized multicenter split-mouth clinical trial. *Head Face Med.* 2015;11(1):37.
- Nishimoto S, Fujita K, Sotsuka Y, Kinoshita M, Fujiwara T, Kawai K, et al. Growth factor measurement and histological analysis in platelet rich fibrin: a pilot study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015;14(4):907-13.
- Eren G, Gürkan A, Atmaca H, Dönmez A, Atilla G. Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin type product. *Platelets.* 2016. [Epub ahead of print].
- Vahabi S, Vaziri S, Torshabi M, Esfahrood ZR. Effects of plasma rich in growth factors and platelet rich fibrin on proliferation and viability of human gingival fibroblasts. *J Dent.* 2015;12(7):504-12.