

# Evaluation of nociception and edema in experimental sciatic nerve compression model in Wistar rats treated with cryotherapy

*Avaliação da nocicepção e edema em modelo experimental de compressão do nervo isquiático em ratos Wistar tratados com crioterapia*

Jhenifer Karvat<sup>1</sup>, Camila Mayumi Martin Kakhata<sup>1</sup>, Lizyana Vieira<sup>1</sup>, Juliana Sobral Antunes<sup>1</sup>, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro<sup>1</sup>, Gladson Ricardo Flor Bertolini<sup>1</sup>

DOI 10.5935/1806-0013.20160073

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Considering the scarcity of studies addressing cryotherapy to treat peripheral nervous injuries, this study aimed at evaluating nociception and edema in an experimental sciatic nerve compression model with Wistar rats treated with cryotherapy.

**METHODS:** Forty-two rats were randomly distributed in groups: G1 – control, euthanized in the 15<sup>th</sup> postoperative day; G2, G3 and G4 – submitted to sciatic nerve compression and euthanized in the 3<sup>rd</sup>, 8<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> postoperative day, respectively; G5, G6 and G7 – submitted to sciatic nerve compression and treated with cryotherapy, euthanized in the 3<sup>rd</sup>, 8<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> postoperative day, respectively. Nociception evaluation at injury site and plantar region, and observation of edema were performed before injury, in the 2<sup>nd</sup> postoperative day and in the day corresponding to euthanasia of each injured group. Mixed ANOVA was used for statistical analysis, considering significant 5%.

**RESULTS:** There has been decreased pain threshold at injury site in injured groups, however there has been increase in the same groups with regard to evaluations in the 8<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> postoperative days. Nociception in the plantar region was similar to previous one, however threshold has not increased. With regard to edema, there has been significant difference in evaluations in the 3<sup>rd</sup> and 2<sup>nd</sup> postoperative days corresponding to G1, G4 and G7, which had higher values as compared to pre-injury.

**CONCLUSION:** Cryotherapy has not increased nociceptive threshold or decreased the edema.

**Keywords:** Cold therapy, Edema, Immersion, Nociception, Peripheral nerve trauma.

## RESUMO

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** Considerando a carência de estudos a respeito da crioterapia como tratamento de lesão nervosa periférica, este estudo teve como objetivo avaliar a nocicepção e o edema em modelo experimental de compressão do nervo isquiático em ratos Wistar, tratados com crioterapia.

**MÉTODOS:** Foram utilizados 42 ratos separados aleatoriamente nos grupos: G1 - controle, eutanasiado no 15º de pós-operatório; G2, G3 e G4 - submetidos à compressão do nervo isquiático, eutanasiados no 3º, 8º e 15º de pós-operatório, respectivamente; G5, G6 e G7 - submetidos à compressão do nervo isquiático e tratados com crioterapia, eutanasiados no 3º, 8º e 15º de pós-operatório, respectivamente. As avaliações da nocicepção no local da lesão e na região plantar, e a verificação do edema aconteceram nos momentos pré-lesão, 2º dia de pós-operatório e no dia correspondente a eutanásia de cada grupo lesionado. A análise estatística foi pela ANOVA mista, com nível de significância de 5%.

**RESULTADOS:** No local da lesão houve diminuição do limiar doloroso nos grupos lesionados, entretanto, apresentou aumento do mesmo nos grupos relacionados às avaliações do 8º e 15º de pós-operatório. Já a nocicepção realizada na região plantar foi semelhante à anterior, porém o limiar não aumentou. Com relação ao edema, houve diferença significativa na avaliação realizada no 3º e no 2º dias de pós-operatório correspondentes ao G1, G4 e G7, que apresentaram valores maiores comparadas com a pré-lesão.

**CONCLUSÃO:** A crioterapia não auxiliou no aumento do limiar nociceptivo e redução de edema.

**Descritores:** Edema, Imersão, Nociceptividade, Terapia por frio, Traumatismo do nervo periférico.

## INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos são alvo de lesões por esmagamento, compressão e transecção. Dentre as lesões nervosas mais comuns nos membros inferiores está a do nervo isquiático, o que acarreta perda funcional, sensitiva e motora, causando um impacto permanente sobre o paciente e sua capacidade de realizar atividades da vida diária<sup>1-3</sup>. Além disso, logo após a lesão nervosa ocorre uma resposta inflamatória, quimiotaxia para o local de células do sistema imune e produção de substâncias químicas que contribuem para as alterações na permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo local, edema e hiperalgesia<sup>4,5</sup>.

No intuito de acelerar a recuperação dos nervos periféricos lesiona-

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Departamento de Biociências e Saúde, Cascavel, PR, Brasil.

Apresentado em 04 de fevereiro de 2016.

Aceito para publicação em 21 de junho de 2016.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: Fundação Araucária. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Endereço para correspondência:**

Rua Universitária, 2069. Jardim Universitário

85819-110 Cascavel, PR, Brasil.

E-mail: gladson\_ricardo@yahoo.com.br

dos, diversas formas de tratamento têm sido propostas. A crioterapia é a aplicação terapêutica do frio que promove redução do fluxo sanguíneo, do metabolismo e da velocidade de condução nervosa, resultando na diminuição da reação inflamatória, da dor e retardo na formação de edema<sup>6,7</sup>.

A crioterapia pode ser aplicada por meio de pacotes de gelo, massagem com gelo, *sprays* e pela imersão. A técnica de imersão, no entanto, esfria uma área maior em comparação com outras modalidades. A crioterapia realizada por aproximadamente 20 minutos é eficaz para se atingir efeitos terapêuticos<sup>7</sup>.

A crioterapia, entretanto, aplicada em áreas nas quais o nervo é superficial, pode causar lesões temporárias<sup>6</sup>. Por outro lado, também existe carência de estudos sobre o emprego da crioterapia como tratamento de lesões nervosas periféricas.

Diante do exposto, o objetivo foi avaliar a nocicepção e o edema em modelo experimental de compressão do nervo isquiático em ratos Wistar, tratados com crioterapia.

## MÉTODOS

O presente estudo caracteriza-se como uma pesquisa quantitativa, experimental e randomizada. A amostra foi composta por 42 ratos da linhagem Wistar, machos, com peso médio de 327±24,84g e idade média de 10 semanas, os quais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), e mantidos no Biotério setorial do Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF), em caixas padrão de polipropileno, em ambiente com temperatura de 23±1°C, com fotoperíodo de 12h, recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram separados aleatoriamente em sete grupos:

- Grupo 1 (G1, n=6) – controle, composto por animais que não foram submetidos a compressão nervosa e crioterapia, eutanasiados no 15º dia após início do experimento;
- Grupo 2 (G2, n=6) – submetidos a compressão nervosa, sem nenhuma forma de tratamento, eutanasiados no 3º pós-operatório (PO);
- Grupo 3 (G3, n=6) – submetidos a compressão nervosa, sem nenhuma forma de tratamento, eutanasiados no 8º PO;
- Grupo 4 (G4, n=6) – submetidos a compressão nervosa, sem nenhuma forma de tratamento, eutanasiados no 15º PO;
- Grupo 5 (G5, n=6) – submetidos a compressão nervosa e tratamento com crioterapia, eutanasiados no 3º PO;
- Grupo 6 (G6, n=6) – submetidos a compressão nervosa e tratamento com crioterapia, eutanasiados no 8º PO;
- Grupo 7 (G7, n=6) – submetidos a compressão nervosa e tratamento com crioterapia, eutanasiados no 15º PO.

### Modelo experimental de compressão do nervo isquiático

Inicialmente os animais foram mantidos no LELRF durante duas semanas para adaptação ao local de estudo. Previamente ao procedimento cirúrgico os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de cetamina (95mg/kg) e cloridrato de xilazina (12mg/kg) por via intraperitoneal. Após a aplicação da anestesia e a verificação do estado de consciência do animal (observado pela ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), os animais foram posicionados em decúbito ventral e foi realizada a tricotomia no local do procedimento cirúrgico.

Em seguida foi realizada uma incisão paralela às fibras do músculo bíceps femoral, expondo o nervo isquiático do membro pélvico direito, com subsequente compressão, com o auxílio de pinça hemostática, por 30 segundos. A pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais, e realizada pelo mesmo indivíduo, utilizando-se como referência o fechamento do segundo dente da cremalheira<sup>8</sup>. Por fim, foi realizada a sutura externa com fio Catgut 4.0, aplicado iodo sobre a incisão e os animais foram alojados nas mesmas condições pré-cirúrgicas, separados de acordo com o seu grupo experimental.

### Protocolo de tratamento

Para a realização do tratamento, os animais foram contidos manualmente e o membro pélvico direito colocado imerso em recipiente de 1.440cm<sup>3</sup> (20cmx12cmx6cm), contendo água e gelo, em temperatura de 5±2°C, durante 20 minutos<sup>9</sup>. Nos grupos G5, G6 e G7 o tratamento ocorreu logo após término do procedimento cirúrgico. Assim, em G5 foi realizada uma única sessão de tratamento e, para G6 e G7, o tratamento continuou do 3º dia de PO e terminou no 7º dia PO. Os animais de G2, G3 e G4 também foram posicionados de acordo com o protocolo de tratamento, embora o recipiente não contivesse água e gelo.

### Avaliação da nocicepção

A avaliação da nocicepção foi por meio do filamento de Von Frey digital<sup>10</sup>. O teste foi realizado com o animal contido manualmente e a ponteira do equipamento aplicada na região do procedimento cirúrgico no membro pélvico direito. A ponta de polipropileno foi aplicada perpendicularmente à área, com gradual aumento de pressão, e logo que o animal retirou a pata o teste foi interrompido para o registro do limiar de retirada. O estímulo foi aplicado também na região plantar do membro acometido e, para isso, o animal foi mantido em caixa elevada com piso de tela. Assim o filamento foi posicionado e realizada pressão local até a retirada do membro pélvico direito.

Essa avaliação foi realizada nos seguintes momentos: pré-lesão, no 2º PO e no dia correspondente à eutanásia de cada grupo lesionado, sendo que o G1 foi avaliado nos mesmos momentos que os grupos submetidos à lesão, porém com eutanásia no 15º dia após início do experimento. Os dados do limiar de retirada foram apresentados baseados na média dos animais do grupo.

### Avaliação do edema

O edema foi avaliado pela alteração volumétrica de líquidos por meio do hidropletismômetro de pata da marca Insight\*. Nesse teste, o membro pélvico direito foi colocado em um recipiente com água, até a imersão completa da articulação do tornozelo, sendo o deslocamento de água graduado. Essa avaliação ocorreu imediatamente após a avaliação da nocicepção, nos mesmos momentos.

### Análise estatística

Os resultados foram analisados com auxílio do programa SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences). A comparação entre os grupos e avaliações foi realizada entre o GC, lesão e lesão com crioterapia, eutanasiados no mesmo PO. Para a normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilk e, constatando-se esta, foi aplicado o teste estatístico ANOVA modelo misto, com nível de significativo aceito de  $\alpha=0,05$ .

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (15/07/2014).

## RESULTADOS

### Nociceção no local da lesão

A análise da nociceção realizada no local da lesão, mostra que houve diferença significativa entre os grupos G1, G2 e G5 [F(2;30)=40,2;p<0,001], sendo o valor do limiar de retirada em G2 e G5 menor que G1, e também houve diferença entre as avaliações, em que as realizadas no 2° e 3° PO apresentaram limiares menores comparados com a pré-lesão (Figura 1A).

G1, G3 e G6 também apresentaram diferença estatística [F(2;30)=18,8;p<0,001], sendo que G3 e G6 mostraram valores menores comparados a G1. Além disso, a avaliação pré-lesão apresentou limiar maior que a realizada no 2° PO, enquanto esta teve limiar menor que a do dia da eutanásia (8°PO) (Figura 1B).

Com relação a G1, G4 e G7, houve diferença estatística [F(2;30)=33,7;p<0,001], sendo que G4 e G7 apresentaram limiares menores comparados com G1. Houve diferença significativa entre

a avaliação pré-lesão que obteve valores maiores que a do 2° PO e esta com valores menores que a avaliação do dia da eutanásia (15° PO) (Figura 1C). Tais resultados apresentaram ausência de efeitos antinociceptivos para os grupos tratados.

### Nociceção na região plantar

De acordo com o resultado da nociceção realizada na pata, G1, G2 e G5, apresentaram diferença [F(2;30)=22,6;p<0,001]. O limiar de G2 e G5 foi estatisticamente menor que G1, o mesmo ocorreu com a avaliação do 2° e 3° PO comparada à pré-lesão (Figura 2A).

Ao comparar os valores de G1, G3 e G6, também houve diferença [F(2;30)=43,4;p<0,001]. Em que G3 e G6 apresentaram limiares menores que G1, e as avaliações do 2° e 8° PO obtiveram limiar menor comparadas com a pré-lesão (Figura 2B).

Ao analisar G1, G4, G7 e as avaliações pré-lesão, 2° PO e do dia da eutanásia (15° PO), observou-se que G4 e G7 obtiveram limiares menores que G1, assim como as avaliações do 2° e 15° PO apresentaram limiares menores comparados à pré-lesão [F(2;30)=23,6;p<0,001] (Figura 2C). Novamente, observou-se ausência de efeitos da crioterapia.

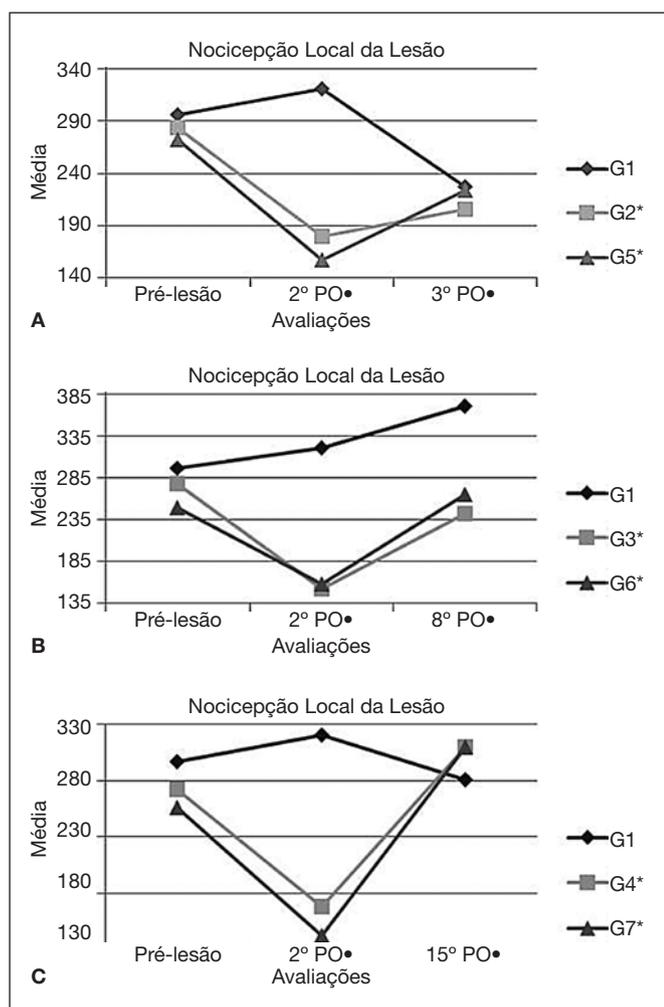


Figura 1. Avaliação do limiar de retirada no local da lesão, pelo uso do filamento de von Frey digital

\*diferença significativa comparada com G1, • diferença significativa comparada com avaliação pré-lesão e • diferença comparada com avaliação no 2° PO.

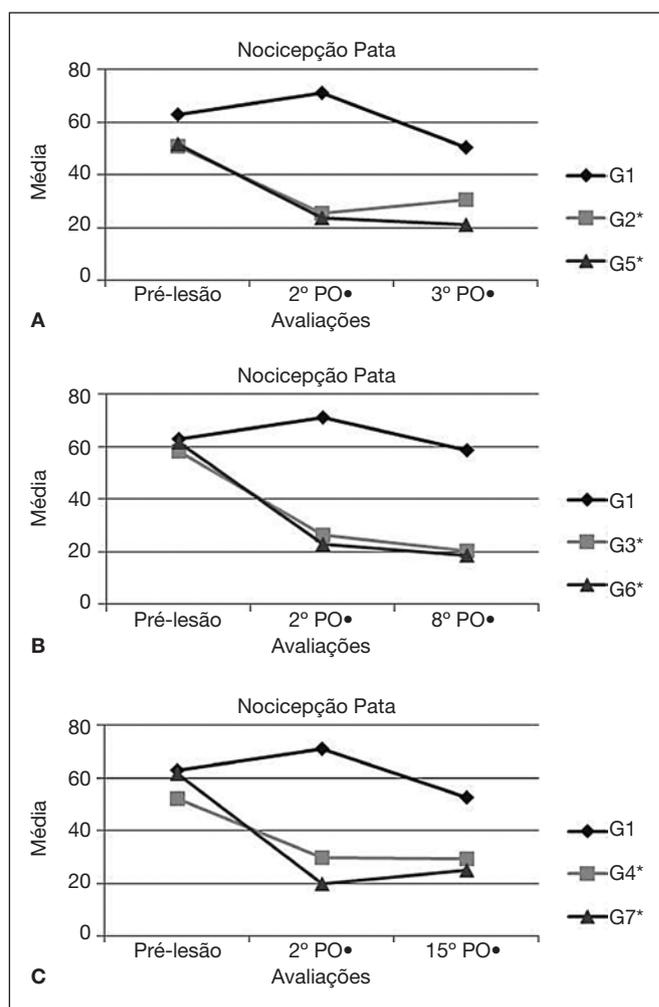


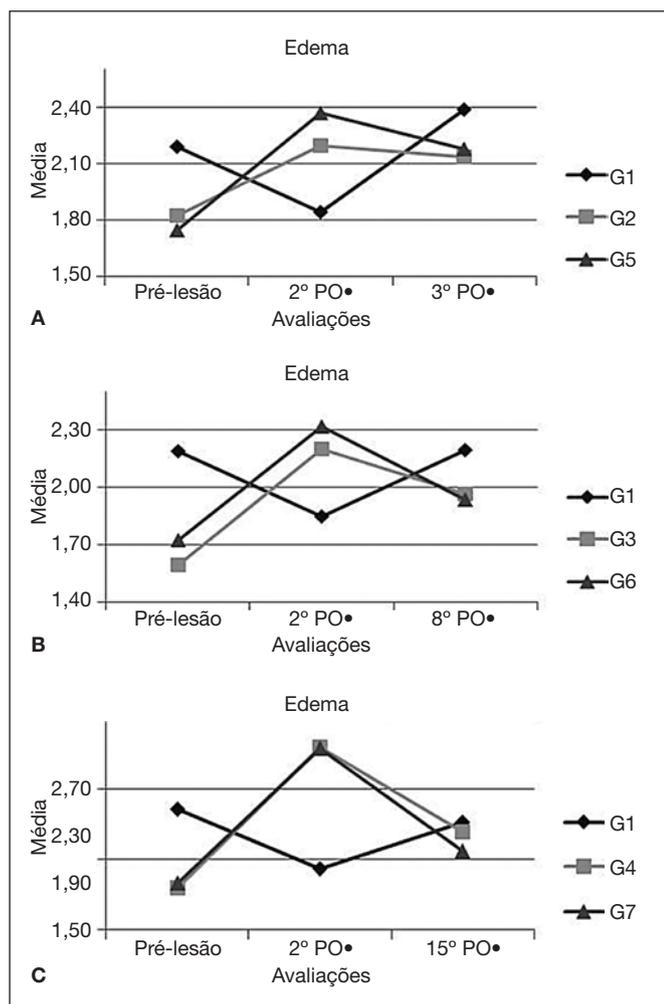
Figura 2. Avaliação do limiar de retirada na região plantar, pelo uso do filamento de von Frey digital

\*diferença significativa comparada com G1, • diferença comparada com avaliação pré-lesão.

## Edema

De acordo com a avaliação do edema, realizada em G1, G2 e G5, houve diferença significativa [ $F(2;30)=4,3;p=0,023$ ] entre a avaliação do 3º PO, que apresentou valores maiores, comparada com a pré-lesão (Figura 3A).

Ao analisar o resultado de G1, G3 e G6, verificou-se que não houve diferença significativa, tanto entre os grupos como entre as avaliações, apresentando estatística [ $F(1,7;30)=3,3;p>0,05$ ] (Figura 3B). Já ao observar os dados relacionados ao G1, G4 e G7, houve diferença estatística entre a avaliação do 2º PO, que apresentou valores maiores comparado com a avaliação pré-lesão [ $F(2;30)=8,5;p=0,01$ ] (Figura 3C), sem efeitos da crioterapia para a redução do edema (Figura 3).



**Figura 3.** Avaliação do edema, pelo uso da hidropletismometria  
• diferença significativa comparada com avaliação pré-lesão.

## DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a nocicepção e o edema de ratos submetidos ao modelo de compressão do nervo isquiático, tratados com crioterapia, objetivando auxiliar na diminuição da nocicepção e do edema. A escolha do rato como animal de experimentação foi pelo fato de apresentar estrutura e resposta de lesões semelhantes às en-

contradas em nervos humanos<sup>11</sup>.

Com relação à nocicepção, a crioterapia poderia ter auxiliado na analgesia, devido à diminuição da velocidade de condução nervosa, inibindo a transmissão dos sinais de dor ao corno posterior da medula espinal, além de atuar como um mecanismo contra irritante, pelo qual a transmissão de dor ao sistema nervoso central é bloqueada<sup>12-14</sup>, contudo, tais resultados não foram observados neste estudo. Com relação à avaliação do edema, estudos mostram que a crioterapia pode diminuir o mesmo em caso de lesão. Em um trabalho experimental, com ratos submetidos a sinovite no joelho direito e tratados com crioterapia de imersão durante 20 minutos a 5°C, foi avaliado o edema por meio de paquímetro metálico e a nocicepção pelo tempo de elevação da pata, sendo que o tratamento foi eficaz para minimizar o edema e a nocicepção dos animais<sup>9</sup>. Em outro estudo o edema foi induzido na pata de ratas e foi tratado tanto por correntes diadinâmicas de Bernard (CDB) como por crioterapia. Na avaliação por hidropletismografia verificou-se que ambas as formas de tratamento foram significativamente eficazes para reduzir o edema, sendo que não houve diferença entre elas<sup>15</sup>. Todavia, as lesões descritas não foram causadas por compressão de nervos periféricos, conforme o realizado no presente estudo.

Neste estudo, o modelo de compressão nervosa produziu edema nos grupos avaliados no 3º PO, mostrando que G2 e G5 apresentaram alteração no volume de líquido maior que a avaliação realizada na pré-lesão, e a crioterapia não foi eficaz para minimizar o edema. Além disso, os grupos relacionados ao 15º PO também apresentaram edema na avaliação do 2º PO, sendo que G4 e G7 se comportaram de maneira semelhante durante as avaliações. Entretanto, sugere-se que houve redução com relação à última avaliação, pois os valores diminuíram mesmo não sendo significativos o que também pode ter auxiliado no aumento do limiar nociceptivo no local da lesão, visto que a analgesia pode ocorrer pela redução do edema<sup>6</sup>. Com relação aos grupos G3 e G6, eles se comportaram de maneira parecida em todos os momentos, sem diferença significativa. Salienta-se que inicialmente, apesar de não existirem diferenças entre os grupos, G1 mostrou médias superiores às dos outros grupos, mas tal variação foi ocasional, podendo ter ocorrido por diferenças do volume dos membros dos animais apenas, ou por dificuldades técnicas para realização da avaliação, visto que os animais (exceto no momento da lesão e prévio à eutanásia) não eram anestesiados, ou seja, movimentavam-se apenas sendo levemente restritos pelo manuseio, inclusive durante o tratamento com crioterapia.

Contudo, apesar de este estudo apresentar que o tratamento com crioterapia não teve efeito sobre a lesão nervosa periférica, na busca da literatura não foram encontrados estudos semelhantes, visando a auxiliar na discussão. Dessa maneira, sugere-se a realização de novas pesquisas, abordando análises histológicas e moleculares, para verificar a eficácia da crioterapia sobre a lesão nervosa, dando base para pesquisas e tratamentos com humanos.

## CONCLUSÃO

A compressão nervosa diminuiu o limiar nociceptivo e gerou aumento no volume das patas dos animais momentaneamente, sendo que o tratamento com a crioterapia não produziu efeitos tanto para a nocicepção quanto para o edema.

## AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelos recursos financeiros do projeto.

## REFERÊNCIAS

1. Craig A. Entrapment neuropathies of the lower extremity. *PM&R*. 2013;5(5 Suppl):31-40.
2. Wood MD, Kemp SW, Weber C, Borschel GH, Gordon T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Ann Anat*. 2011;193(4):321-33.
3. Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;82-83:160-7.
4. Dubový P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Ann Anat*. 2011;193(4):267-75.
5. Rocha AP, Kraychete DC, Lemonica L, de Carvalho LR, de Barros GA, Garcia JB, et al. [Pain: current aspects on peripheral and central sensitization]. *Rev Bras Anesthesiol*. 2007;57(1):94-105. English, Portuguese.
6. Gutiérrez Espinoza HJ, Lavadi Bustamante IP, Méndez Pérez SJ. Revisión sistemática sobre el efecto analgésico de la crioterapia en el manejo del dolor de origen músculo esquelético. *Rev Soc Esp Dolor*. 2010;17(5):242-52.
7. Hanks J, Levine D, Bockstahler B. Physical agent modalities in physical therapy and rehabilitation of small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2015;45(1):29-44.
8. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, et al. Nerve crush injuries - a model for axonotmesis. *Exp Neurol*. 1994;127(2):284-90.
9. Moreira NB, Artifon EL, Meireles A, Silva LI, Rosa CT, Bertolini GR. A influência da crioterapia na dor e edema induzidos por sinovite experimental. *Fisioter Pesqui*. 2011;18(1):79-83.
10. Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(3):391-9.
11. Savastano LE, Laurito SR, Fitt MR, Rasmussen JA, Gonzalez Polo V, Patterson SI. Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. *J Neurosci Methods*. 2014;227:166-80.
12. Corti L. Nonpharmacological approaches to pain management. *Top Companion Anim Med*. 2014;29(1):24-8.
13. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211(1):39-50.
14. Gosling AP. Mecanismos de ação e efeitos da fisioterapia no tratamento da dor. *Rev Dor*. 2012;13(1):65-70.
15. Oda JY, Garnés FL, Martins AJ, Takemura OS. Efeitos da crioterapia vs correntes diadinâmicas na redução do edema de pata em ratas. *Arq Ciênc Saúde UNIPAR*. 2014;18(2):107-11.