

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE POSGRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM NO PROCESSO  
INFLAMATÓRIO**

**MARIA CRISTINA SANDOVAL ORTIZ**

**SÃO CARLOS  
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE POSGRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM NO PROCESSO  
INFLAMATÓRIO**

**María Cristina Sandoval Ortiz**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Fisioterapia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini.**

**SÃO CARLOS  
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

O77ee

Ortiz, Maria Cristina Sandoval.

Efeito da estimulação elétrica de alta voltagem no processo inflamatório / Maria Cristina Sandoval Ortiz. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

82 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Eletroterapia. 2. Estimulação elétrica. 3. Edema. 4. Inflamação. I. Título.

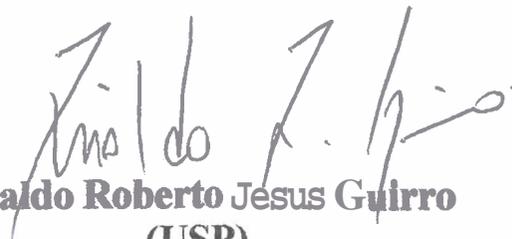
CDD: 615.845 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE  
Maria Cristina Sandoval Ortiz, APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE SÃO CARLOS, EM 16 DE ABRIL DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:



**Tânia de Fátima Salvini**  
(UFSCar)



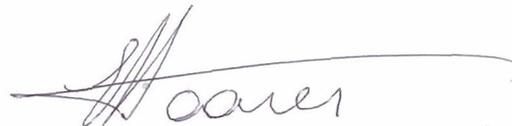
**Rinaldo Roberto Jesus Guirro**  
(USP)



**Débora Bevilaqua Grossi**  
(USP)



**Nivaldo Antonio Parizotto**  
(UFSCar)



**Edson Garcia Soares**  
(USP)

Dedico este trabalho as pessoas que se sacrificaram para que eu pude-se alcançar este logro: meu marido e minhas filhas

## AGRADECIMENTOS

A experiência vivenciada neste período de minha vida esteve sempre acompanhada por muitas pessoas que me ajudaram e ofereceram sua colaboração, apoio e conselho nos momentos mais difíceis. Agradeço por sua ajuda e são nestes momentos quando conhecemos a verdadeira amizade. Não tenho muita facilidade para expressar os meus sentimentos como os meus amigos brasileiros, mas cada uma destas simples palavras esta escrita com sinceridade e desde o meu coração.

Começando agradeço a Deus, a quem devo tudo o que sou. Ele deu-me força suficiente para suportar os momentos mais difíceis desta dura prova ao estar separada de minha família, meus amigos e de um maravilhoso país chamado Colômbia. Mas também este Deus permitiu-me conhecer mais profundamente a cultura brasileira, seus costumes e principalmente muitas pessoas valiosas que com suas grandes qualidades e seu trabalho fazem a cada dia que passa, este país avançar rumo a um futuro melhor.

Agradeço também aos meus pais por seu amor refletido na sua colaboração e apoio permanente.

Meu marido Ramiro, que mostrou seu grande amor, sem egoísmo, ao permitir-me fazer realidade este sonho para o qual ele sempre me apoiou e foi a mola propulsora para que não sentisse desânimo e continuasse na luta ate o final.

As minhas filhas Ana María e María Paula, a quem subtraí momentos de convivência da melhor fase de suas vidas e sofreram pela minha ausência; espero me perdoem e lembrem que vocês são a minha razão de viver.

A Tania por sua bondade e espírito aberto para apoiar e permitir o desenvolvimento da Fisioterapia em outros países. Alem disso, por sua amizade e por ser um exemplo de vida como Profissional e principalmente como pessoa.

A minha grande amiga Esperanzilla, que como sempre, mostrou-me sua amizade com seus conselhos e sua grande ajuda. Sempre serei grata a você e a sua família e espero continuemos lutando em nosso país pelo desenvolvimento da Fisioterapia.

A Dianita Camargo por sua ajuda e orientação no desenvolvimento desta pesquisa, mas principalmente por ser minha amiga e confortar-me nos momentos difíceis deste processo.

A Carolina que passou de ser minha estudante a uma amiga incondicional. Obrigada por sua colaboração e ter-me acompanhado e apoiado nas minhas estâncias em Brasil.

A Thiago por ser uma pessoa tão especial e tão colaborador como poucas tem conhecido na minha vida. Sua forma de ser unido a suas capacidades profissionais vão permitir um grande sucesso na sua vida.

A Paulinha por sua grande ajuda e por ter sempre um sorriso que alegra a vida de todos. Tomara que a vida não mude a você porque o mundo precisa de mais gente assim.

A Gabriel por sua colaboração e tudo o que me ajudou no aprendizado das técnicas do laboratório.

A João que mudava o laboratório com suas brincadeiras e estou muito agradecida por sua colaboração.

A todos os companheiros do laboratório (os anteriores e os seguintes: Christiane, Dório, Jamacy, Sabrina, Mariana, Lúcia, Marcela e Teresa) por todos os momentos de convivência agradáveis.

À professora Stela Mattiello, que continuo sua orientação ao igual que durante o mestrado.

Aos amigos de outros laboratórios como o Diogo por sua amizade e ter-me permitido conhecer um pouquinho da cozinha brasileira. Também a Davilene por estar sempre disposta a ajudar quando a gente precisar.

Ao professor Nivaldo Parizotto que acreditou em mim permitindo-me viver esta experiência.

Ao professor Carlão, um verdadeiro maestro que me ensinou uma nova visão da eletroterapia

As companheiras da Escuela de Fisioterapia da Universidad Industrial de Santander, especialmente a Aminta, Solange e Claudia por facilitar a realização desta formação. Espero poder retribuir seu sacrificio neste período contribuindo para o crescimento do Programa. Também não posso esquecer a Martha nossa secretaria por sua eficiência na realização de todos os tramites que eu precisei durante este período.

A CNPq por seu apoio durante uma parte de meu doutorado.

A esta instituição, Universidade Federal de São Carlos, pois aqui vivi meu mestrado e doutorado e aprendi que um professor tem como objetivo formar mentes com a essência de um pesquisador; porem um pesquisador deve buscar não apenas sua realização profissional, mas sim aportar, assim seja um pouquinho, para o bem da humanidade e principalmente mantendo a humildade.

E a todas as pessoas que não estão aqui, mas que contribuíram de alguma forma na concretização do presente trabalho.

## RESUMO

A inflamação é uma resposta de proteção para livrar o organismo da causa da agressão e de suas conseqüências, para poder alcançar a reparação. Este processo apresenta-se em muitas das enfermidades atendidas pelos fisioterapeutas, mas às vezes sua exacerbação pode limitar a recuperação do sujeito. Uma das formas de tratamento do processo inflamatório é a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV). Este tipo de estimulação é caracterizada por um pulso monofásico pico duplo que gera voltagens superiores a 150V, mas com uma corrente total (média) liberada ao tecido que não excede 1,2 a 1,5mA. Vários estudos foram feitos para avaliar o efeito da EEAV no edema, mas a maioria deles foram realizados em modelos animais, sendo encontrado apenas um estudo em humanos na literatura. Os resultados dos trabalhos em animais têm mostrado a efetividade da EEAV na diminuição do edema contrastando com o estudo em humanos, o qual somente mostrou diferenças clínicas, mas não estatísticas. Adicionalmente, ainda não se conhece o mecanismo de ação da EEAV e têm sido propostas varias hipóteses para explicar este efeito. O objetivo do estudo foi determinar a efetividade da EEAV na inflamação em animais e em humanos utilizando um nível de amplitude submotor, freqüência de 100pps e 45min de tratamento. Foi feito um ensaio clínico controlado e aleatorizado em sujeitos com entorse lateral de tornozelo mensurando dor, edema, arco de mobilidade e alguns parâmetros da marcha, comparando três grupos: grupo controle (GC) com fisioterapia convencional; grupo com fisioterapia convencional mais EEAV polaridade negativa e o último grupo com fisioterapia convencional mais EEAV polaridade positiva. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos de estudo, somente diferenças em aspectos clínicos sugerindo uma possível contribuição da EEVA com polaridade negativa na resolução do processo inflamatório. Em uma segunda etapa foi feito um estudo experimental em animais avaliando dor, edema, histamina e albumina séricas e a cartilagem. Os grupos foram: um grupo controle, um inflamado e tratado com EEAV(-), um inflamado e que recebeu EEAV placebo e mais um grupo somente tratado com EEAV(-). Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas variáveis mensuradas, mas observou-se menor celularidade na cartilagem dos animais inflamados+EEAV(-) e menor densidade óptica no grupo inflamado+EEVA placebo. Estes resultados são uma contribuição para a validação de um agente biofísico utilizado na fisioterapia, mas precisa-se realizar mais estudos clínicos com amostras maiores para conhecer os reais efeitos da EEAV no processo inflamatório.

**Palavras claves:** edema, inflamação, estimulação elétrica, entorse

## ABSTRACT

Inflammation is the response of protection of the body to an aggression in order to obtain the healing. This process makes part of many diseases attended by physical therapist, however when it is increased, limits the fast recovery of the patient. High voltage pulsed current (HVPC) is one of the modalities used to interview of inflammatory process; the type of stimulation is considered monophasic pulsed that produces a high-driving voltage 150 V, but the total current (average) delivered to the tissue per second does not exceed 1.2 to 1.5mA. There are many studies that evaluate the effect of HVPC in swelling, but the major part was made in animal models and only one in human beings was found in the review of the literature. The results of the studies in animals had showed the effectiveness of HVPC in reduction of edema, but the study in human only showed clinical differences not statistically significant. Additionally, the action mechanism of HVPC is unknown and some hypotheses have been proposed for explaining its effect. The objective of this study was evaluate the effectiveness of HVPC in the inflammation process, both in humans and animals in a submotor level, 100pps of frequency and 45min of treatment. We made a controlled and randomized clinical trial in subjects with lateral sprain of ankle measuring pain, edema, range of mobility and some parameters of the gait comparing three groups: control group (CG) with standard physical therapy, HVPC(-) with standard physical therapy plus HVPC negative polarity and HVPC(+) with standard physical therapy plus HVPC positive polarity. There was not difference between the study groups, but the clinical results suggested that HVPC(-) could contribute to accelerate the recovery of inflammatory process. Second, an experimental study was done in animals evaluating pain, edema, serum histamine and albumin and the cartilage, comparing a control group, a inflammation group with HVPC(-), a inflammation group with HVPC placebo and the last group only with HVPC(-). We did not find differences between the groups in the variables, only observed the lowest cellularity in the cartilage of inflammation group+HVPC(-) and lowest optical density in inflammation group+HVPC placebo. These results are a contribution for the understanding of the biophysical agent used in the physical therapy, however is necessary more clinical studies including higher sample size, in order to demonstrate the effects of HVPC on the inflammation process.

**Key Words:** swelling, inflammation, electrical stimulation, sprain

## **LISTA DE FIGURAS**

	<b>P</b>
FIGURA 1. Esquema de estrutura do endotélio	16
FIGURA 2. Vias de transporte de substancias no endotélio vascular	18

## **SUMÁRIO**

	<b>P</b>
<b>1. APRESENTAÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2. CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>14</b>
2.1 Processo inflamatório	14
2.1.1 Histamina	15
2.2 Fisiologia da permeabilidade dos microvasos	15
2.2.1 Teorias do transporte endotelial	17
2.2.2 Albumina	18
2.3 Modelo inflamatório da carragenina	19
2.4 Estimulação elétrica de alta voltagem	20
2.4.1 Mecanismos de atuação da EEAV	21
<b>3. MANUSCRITO 1</b>	<b>27</b>
<b>4. MANUSCRITO 2</b>	<b>46</b>
<b>5. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO</b>	<b>64</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>82</b>

## 1. APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em duas partes. A primeira apresenta uma revisão geral dos tópicos que fundamentaram o desenvolvimento do projeto. A segunda parte contém os manuscritos científicos com os principais resultados do projeto.

A inflamação é um processo que acompanha a maior parte das doenças atendidas pelos fisioterapeutas e as complicações na sua resolução são uma limitação para o rápido retorno do sujeito às atividades de vida diária.

As modalidades físicas ou agentes biofísicos constituem uma das ferramentas básicas utilizadas pelos fisioterapeutas para o tratamento da inflamação. As modalidades físicas oferecem muitas vantagens tais como: a facilidade na aplicação, não são invasivas e não apresentam, de modo geral, efeitos adversos quando comparados aos fármacos. No entanto, a efetividade dos agentes físicos não está ainda devidamente esclarecida, principalmente pelos resultados contraditórios dos estudos já realizados. Um dos problemas é a ausência de rigor metodológico na realização das pesquisas, assim como os interesses econômicos de grupos que produzem e comercializam esses equipamentos, sem realizar investigações adequadas sobre seus efeitos. Esses aspectos têm dificultado a indicação terapêutica desses recursos, baseado em evidência científica.

Levando em conta estes aspectos durante o mestrado desenvolvi um estudo em coelhos, para determinar o efeito do laser de baixa potencia nas inflamações articulares. Mas desta vez no doutorado continuamos a estudar a inflamação, mas avaliando agora o efeito da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) em ratos e em humanos. Consideramos importante realizar a pesquisa em humanos, por que na revisão da literatura só foi encontrado um estudo experimental sobre este tópico e ausência de ensaios clínicos controlados que indicam a melhor evidência.

No projeto desenvolvido com animais foram feitas mensurações de sinais e marcadores da inflamação. Adicionalmente, foram analisados a cartilagem e os músculos funcionalmente relacionados à articulação acometida. Como produtos deste trabalho foram escritos dois manuscritos já submetidos, e mais um que está em fase final de preparação. A análise dos músculos esqueléticos foi desenvolvida por uma aluna de mestrado e constituiu sua dissertação, gerando também um manuscrito científico já submetido a publicação (anexo

B). Com o propósito de contextualizar o leitor ao conteúdo dos manuscritos finais, a seguir são apresentados os tópicos que fundamentaram o desenvolvimento do projeto.

## 2. CONTEXTUALIZAÇÃO

### 2.1 Processo inflamatório

A inflamação começa quando um estímulo endógeno ou exógeno causa uma alteração na fisiologia normal de um tecido<sup>1,2</sup>. A inflamação constitui, portanto uma resposta de proteção, cujo objetivo é livrar ao organismo da causa inicial da agressão celular e das conseqüências desta agressão<sup>2</sup>. Esses fenômenos se manifestam clinicamente mediante cinco sinais básicos da inflamação: dor, rubor, calor, tumor e alteração da função.

A inflamação pode ser classificada como aguda e crônica. A primeira é a resposta imediata e inicial a um agente agressor, e compreende principalmente alterações no calibre vascular<sup>2</sup>. A inflamação crônica caracteriza-se pela infiltração de células mononucleares, refletindo uma reação persistente à agressão<sup>2</sup>.

O processo inflamatório inicia-se com a liberação de mediadores pró- inflamatórios tais como histamina, serotonina, catecolaminas, bradicinina, fatores complemento e prostaglandinas, que são responsáveis pelo desencadeamento das fases seguintes da inflamação. A etapa inicial da inflamação está caracterizada pelas mudanças vasculares, apresentando-se inicialmente constrição arteriolar e depois dilatação das arteríolas pré-capilares, abertura dos esfíncteres capilares e dilatação das vênulas; esta seqüência é responsável pela hiperemia, evento indispensável para que se produza posteriormente a exsudação<sup>2</sup>. Gera-se também um aumento no fluxo sanguíneo, que produz calor e rubor, característicos da inflamação. Posteriormente, há extravasamento ao interstício de um líquido chamado de transudado. Isto faz com que a pressão osmótica intravascular diminua e aumente a pressão osmótica intersticial.

Estes fenômenos, associados ao aumento da pressão hidrostática dos vasos, causam um desequilíbrio de forças<sup>1,2</sup>, levando à saída de células, macromoléculas e fluidos do sistema vascular, os quais vão acumulando-se no tecido intersticial produzindo-se então o edema<sup>2</sup>. Nos primeiros 15 a 30 minutos após a lesão o endotélio permanecerá permeável devido, principalmente, à formação de lacunas intercelulares principalmente nas vênulas<sup>1,2</sup>. Em seguida, em uma segunda fase que pode durar horas, as lacunas também aparecem nos capilares<sup>3</sup>. Todos os processos mencionados contribuem para produzir edema, além da obstrução ou sobrecarga do fluxo linfático<sup>1,4</sup>.

Recentemente, tem sido proposto que o mecanismo principal que desenvolve o edema é a rápida diminuição da pressão do fluxo intersticial, principalmente no caso das lesões químicas, sendo um exemplo o modelo da *carragenina*<sup>5</sup>. O interstício está conformado por filamentos de proteoglicanas e feixes de fibras colágenas, os quais têm em anexo fibroblastos, mantendo uma rede unida graças às integrinas. No caso de lesão há rompimento das cadeias entre os fibroblastos e as selectinas, permitindo a expansão do interstício e a área edemaciada<sup>5</sup>.

O acúmulo de líquido pela estase piora o processo inflamatório, resultando em um ambiente tóxico, que promove a morte celular e necrose tecidual<sup>1</sup>, que por sua vez pode dificultar ou interromper a troca de nutrientes, atrasando o processo de cicatrização. O acúmulo de líquido no interstício celular produz dor, que gera um maior período de imobilização da zona lesada e aumenta o edema, criando-se um círculo vicioso. Também pode gerar fibrose, aderências e a rigidez da estrutura, trazendo como consequência seqüelas e o aumento no período de recuperação do sujeito<sup>2,6</sup>.

### **2.1.1 Histamina**

A histamina é uma amina dibásica vaso ativa derivada da histidina. A histamina pré-formada é armazenada em grânulos metacromáticos dos basófilos e dos mastócitos. Um estímulo agressor pode gerar lise do mastócito ou do basófilo durante a qual o conteúdo dos grânulos é liberado<sup>7</sup>. A histamina livre une-se a receptores específicos, que se encontram na membrana celular das células alvo. Três receptores de histamina foram caracterizados: H1, H2 e H3<sup>8</sup>. A histamina está associada ao mecanismo da dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade das vênulas, sendo o principal mediador do aumento da permeabilidade vascular na fase inicial da inflamação<sup>2</sup>.

### **2.2 Fisiologia da permeabilidade dos microvasos**

O endotélio é composto por camadas de células que proporcionam uma barreira semipermeável, permitindo o movimento de substâncias específicas, fluidos, ou macromoléculas entre o sangue e o interstício<sup>9,10</sup>. Além disso, opera como um órgão dinâmico e multifuncional porque controla o tônus vascular, a homeostase, a saída dos leucócitos e

regula a inflamação<sup>8</sup>. Portanto, a modulação da barreira endotelial é o principal regulador da saída de macromoléculas do sistema vascular<sup>9</sup>.

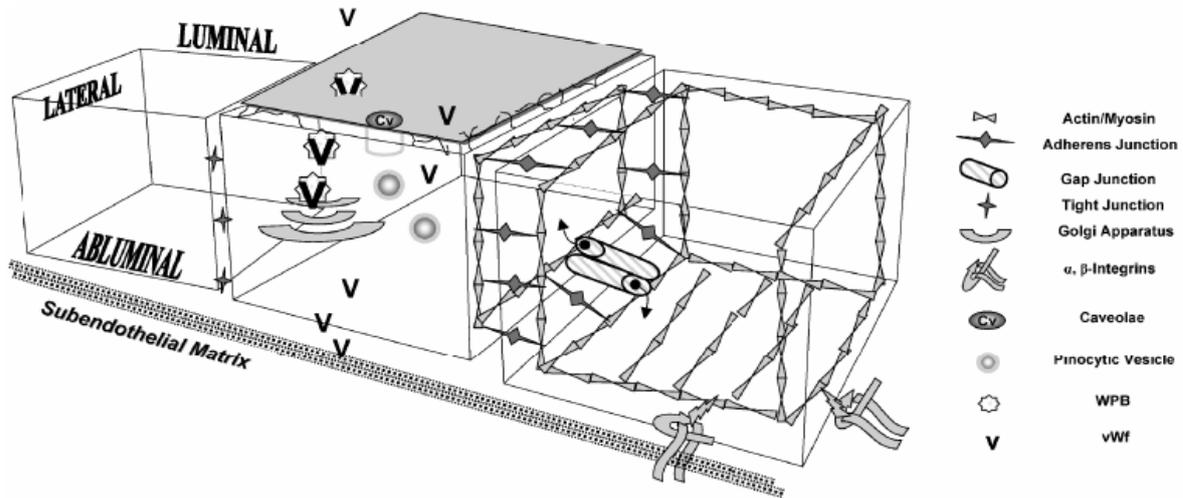


Figura 1. Esquema de estrutura do endotélio. Fonte: Duffy TC, Kirby R, Rudloff E. State of the art review. Critical role of the vascular endothelial cell in health and disease: a review article. *J Vet Emerg Critical Care*. 2004;14,2: 84-99.

Na figura 1 inclui-se o esquema da estrutura do endotélio o qual está composto por três camadas de células: luminal, abluminal e lateral. A camada luminal constitui uma interface entre o sangue circulante e as células endoteliais e sua estimulação afeta à permeabilidade vascular, a coagulação e as respostas inflamatórias. A camada abluminal está acima do subendotélio que é uma matriz extracelular composta de proteínas. As camadas luminal e abluminal estão conectadas pelas camadas laterais. Entre as células endoteliais adjacentes as camadas laterais formam uma fina fenda onde as junções inter-endoteliais estabelecem pontos de comunicação. Estas junções compreendem as junções compactas, as junções de adesão e as lacunas. As duas primeiras formam um zíper pericelular ao longo do bordo da célula<sup>11</sup>. As lacunas endoteliais estabelecem contato entre as células endoteliais adjacentes e a matriz subendotelial formando canais transmembrana. Os estudos mostram que boa parte delas tem comunicação com as fissuras intercelulares, principalmente na presença da histamina<sup>3</sup>. Por sua vez estas junções estão em contato com a actina do citoesqueleto, permitindo mudanças na forma e tamanho das células endoteliais<sup>11</sup>.

Outro elemento que faz parte do endotélio são as vesículas e cavernas, e que estão encarregadas do transporte das grandes moléculas, principalmente a albumina por um mecanismo conhecido como transcitosis<sup>5</sup>. Finalmente todo o endotélio está coberto com

glicoproteínas ou também chamado de glicocálice e sua distribuição assimétrica gera uma polaridade mantida<sup>11</sup>.

A função da barreira endotelial portanto é regulada pelo ajuste de duas forças antagônicas que são a tensão centrípeta do citoesqueleto, que gera deformação das células endoteliais e em oposição às forças centrífugas das junções de adesão da matriz-célula e célula-célula, que tentam resistir a estas deformações<sup>12</sup>. Uma mudança na forma da célula permite a formação das lacunas e a saída de proteínas plasmáticas ao espaço intersticial.

### **2.2.1 Teorias do transporte endotelial**

A teoria do transporte endotelial mais conhecida é a dos poros, onde é definida a barreira endotelial como uma peneira capaz de discriminar o transporte de solutos segundo seu peso molecular através de poros de tamanho seletivo<sup>3</sup>.

Recentemente, foi proposta a teoria da matriz fibrosa onde o filtro é assumido por um tecido fibroso associado ao glicocálix celular endotelial e possivelmente estendido até as fissuras atuando como uma barreira às macromoléculas<sup>5</sup>. Esta barreira oferece uma grande resistência ao fluxo da água e, principalmente, aos solutos grandes tais como a albumina, enquanto que para os pequenos solutos é mínima ou inexistente<sup>5</sup>.

O intercâmbio da água, gases, solutos e células entre os compartimentos intersticiais e vasculares acontecem através dos capilares e vênulas<sup>9</sup>. O endotélio mantém a seletividade macromolecular por meio de mecanismos tais como o tamanho, a forma e a carga elétrica das moléculas. Um exemplo é a carga altamente negativa da camada de glicocálix que constitui uma forma de rejeição eletrostática, limitando as macromoléculas carregadas negativamente ao espaço vascular<sup>11</sup>.

O transporte de substâncias no endotélio ocorre por duas vias: a paracelular e a transcelular (figura 2). A primeira é feita através das junções intercelulares e é mais passiva permitindo a passagem de água e pequenos solutos. A segunda ou transcelular é para moléculas maiores de 3nm tais como a albumina, que cruza o endotélio desde a camada luminal até a abluminal pelo grande sistema móvel de vesículas<sup>3,5</sup>. O transporte nas junções acontece em resposta a mediadores pró - inflamatórios tais como a histamina ou a trombina, que alteram a organização das proteínas das junções intercelulares, permitindo a formação ou aumento do tamanho das lacunas, bem como o estresse da actina para permitir a saída de albumina pela via paracelular.

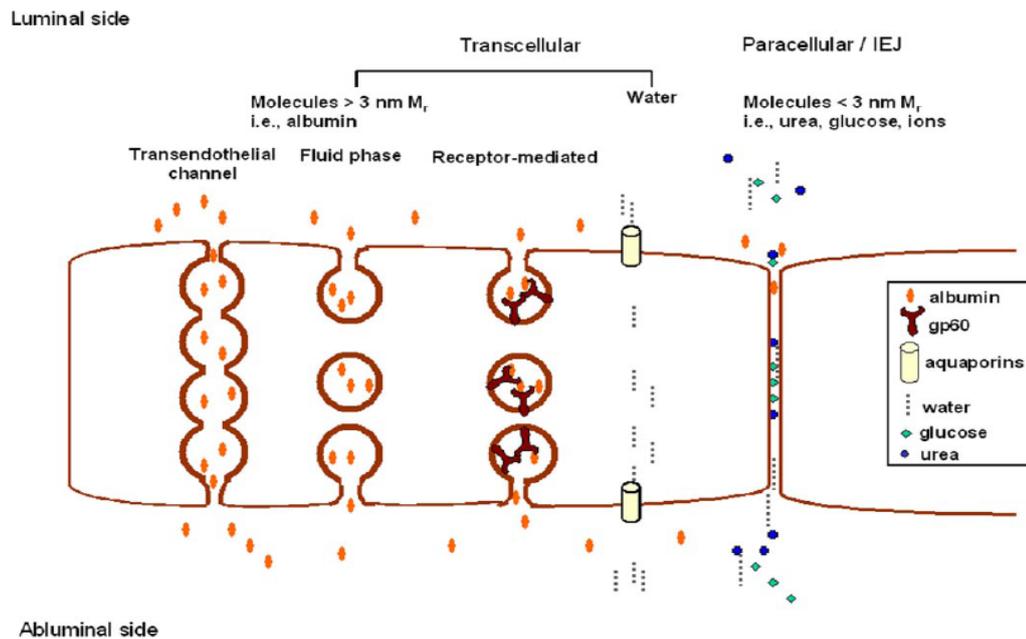


Figura 2. Vias de transporte de substâncias no endotélio vascular. Fonte: Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Ver.* 2006;86:279-367.

O transporte transcelular ou transcitosis inicia-se com a união da albumina às proteínas, que geram a formação da caverna e a seguir a albumina é endocitada. Logo é liberada uma vesícula que vai ser transportada pelo citoplasma para chegar até o lado abluminal do endotélio onde se funde e permite a saída da albumina por exocitosis<sup>11</sup>.

Este controle pode ser alterado por diversas doenças que aumentam a permeabilidade microvascular, predominantemente das vênulas, às macromoléculas e à água, o que é a base da formação do edema. Este processo pode ser mediado por mecanismos dependentes dos leucócitos ou por uma regulação farmacológica da barreira endotelial, através de receptores que ativam o endotélio.

### 2.2.2 Albumina

A albumina humana constitui 50% das proteínas presentes no plasma sanguíneo de indivíduos sadios normais. Sua alta concentração no plasma e forte carga negativa fazem com que esta proteína seja responsável por 70% da pressão oncótica e, portanto, modula a distribuição do fluxo nos espaços intra e extravascular, sendo um importante marcador destes processos. Além disso, a albumina transporta uma variedade de substâncias tais como colesterol, ácidos gordurosos, óxido nítrico, D - glicose, D- galactose e hormônios dentre outros<sup>12</sup>.

### 2.3 Modelo inflamatório da carragenina

A carragenina é um modelo utilizado desde 1962 para investigar a fisiopatologia da inflamação local aguda. Carragenina é o nome genérico para uma classe de galactanas sulfatadas, que é parte constituinte da parede celular de diversas espécies de algas marinhas vermelhas<sup>13,14,15</sup>. Há três tipos principais de carragenina:  $\kappa$  (*kappa*),  $\lambda$  (*lambda*), e  $\iota$  (*iota*).

A carragenina ativa um grande número de mediadores inflamatórios tais como os produtos do metabolismo do ácido araquidônico, principalmente prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), as bradicininas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ )<sup>16</sup>, substância P, neurocininas, citocinas, óxido nítrico dentre outros<sup>15</sup>.

A parte inicial da inflamação produzida pela carragenina está caracterizada pela infiltração de neutrófilos no espaço perivascular, o qual está acompanhado da liberação local de compostos lesivos tais como glutamato, aspartato, substância P, histamina e serotonina<sup>17-21</sup>. Estas substâncias geram edema e sensibilizam os aferentes primários resultando em hiperalgesia primária<sup>22</sup>.

A segunda fase da inflamação está relacionada a uma elevada produção de óxido nítrico, prostaglandinas, radicais livres e ciclo - oxigenases que ativam os neurônios do corno dorsal da medula gerando sensibilização central, espinal ou supra espinal, a qual junto com o aumento da sensibilidade dos nociceptores periféricos, é manifestada como hiperalgesia secundária<sup>17,21,23</sup>. Esta última é geralmente observada nas áreas adjacentes à lesão e algumas vezes em localizações distantes.

A carragenina produz também uma reação sistêmica em resposta à inflamação local consistente com uma resposta de fase aguda. Algumas das mudanças apresentadas são aumento dos granulócitos, do fibrogênio no plasma, da IL-6, da reatividade das plaquetas e da expressão da antitrombina III bem como redução do tempo da protombina<sup>24</sup>.

Vários estudos<sup>15,16,25-29</sup> têm reportado que o pico do edema e dor produzido pela carragenina ocorre em 4-5 horas após da aplicação, com o edema persistindo por 24 horas para depois diminuir lentamente. O processo crônico com presença de macrófagos persiste até 4 semanas após a introdução da carragenina<sup>19,30-31</sup>.

Os mecanismos da dor e edema induzidos pela carragenina nos tecidos como músculo e articulação são diferentes<sup>32,33</sup>. Nos músculos, os nociceptores incrementam sua atividade similar aos neurônios do corno dorsal, os quais mostram diminuição do limiar à estimulação lesiva<sup>34</sup> e a inflamação acontece principalmente no epimísio e perimísio<sup>35</sup>. No estudo de

Radhakrishnan<sup>35</sup> a articulação de joelho e o músculo gastrocnemius injetados com carragenina mostraram padrões similares de inflamação aguda durante a primeira semana, apresentando hemorragia moderada, edema e um mínimo infiltrado de células inflamatórias, principalmente neutrófilos. Além disso, na articulação houve micro necrose e exsudado fibrilar no espaço articular<sup>35</sup>. Outros estudos têm encontrado proliferação e infiltração da membrana sinovial, diminuição da síntese e quantidade das proteoglicanas e da espessura da cartilagem<sup>36-38</sup> e diminuição gradual do número de células no líquido sinovial, após 24 horas da indução da inflamação.

## 2.4 Estimulação elétrica de alta voltagem

A aplicação da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) tem sido reportada como uma forma de tratamento para o edema pós traumático, mas a sua real efetividade não foi ainda estabelecida. Este tipo de corrente se caracteriza por gerar uma voltagem maior do que 150V, apesar de ter uma corrente total baixa (1.5mA). Produz um pulso monofásico duplo pico, com uma duração muito curta (5 – 100 $\mu$ s) e intervalos interpulsos maiores. Estas características geram pouca ou nenhuma reação eletroquímica entre a pele e os eletrodos de estimulação e, portanto provocam uma sensação mais confortável. Outras vantagens deste tipo de corrente são uma maior penetração e melhor discriminação entre a resposta motora e a sensorial quando utilizadas diferentes intensidades<sup>39,40</sup>.

A maior parte dos estudos para comprovar a efetividade da EEAV sobre o edema foram feitos em animais e só identificamos um em humanos<sup>6</sup>. Neste estudo clínico, Griffin et al.<sup>6</sup> compararam os efeitos da EEAV com polaridade negativa (-), a compressão e ou tratamento placebo no edema pós traumático crônico da mão. Os autores não encontraram diferença significativa entre a EEAV(-) e a compressão, mas sim uma diferença clínica favorável para o grupo tratado com EEAV(-) comparado ao grupo placebo.

Dentre os estudos com animais, os de Bettany et al.<sup>41</sup> e Taylor et al.<sup>42</sup> foram dos mais conclusivos mostrando o efeito positivo da EEAV(-) sobre o edema. Os autores observaram grande diminuição do edema nas patas traumatizadas de rãs tratadas com EEAV(-) (75 $\mu$ s, 120Hz, amplitude em um nível submotor). Mohr et al.<sup>43</sup> também fizeram um trabalho experimental com ratos, aplicando uma frequência de 80pps e uma duração de pulso de 35 $\mu$ s, onde se observou uma grande diminuição do edema, mas não diferença estatística respeito ao grupo controle.

Thorton et al.<sup>44</sup> encontraram resultados diferenciais dos efeitos da EEAV(-) no edema com parâmetros similares aos estudos anteriores<sup>42-44</sup>, assim a diminuição do edema apresentou-se em duas espécies de ratos (Zucker-Lean e Brown Norway) mas não nas Sprague-Dawley. O grupo de Dolan e Mendel<sup>45,46</sup> tem feito várias pesquisas nesse tema. Em uma delas<sup>45</sup> compararam o efeito do antiinflamatório ibuprofeno com a EEAV(-) sobre o edema pós traumático em patas de rãs, aplicando uma intensidade de 90% do umbral motor e 120pps por 3 horas contínuas. Observaram diminuição significativa do edema com os dois tratamentos quando comparados ao grupo controle, mas sem diferenças entre eles. Resultados similares foram encontrados quando compararam os efeitos da EEAV(-) com a crioterapia<sup>46</sup> no mesmo modelo de trauma.

A revisão da literatura mostra que os parâmetros tais como tipo de corrente, polaridade, tempo de aplicação e nível de estimulação são críticos no tratamento efetivo do edema, porque há vários estudos mostrando resultados negativos com corrente alternada<sup>47,48</sup>, polaridade positiva<sup>49,50</sup>, e nível de amplitude motor<sup>51,52</sup>.

#### **2.4.1 Mecanismos de atuação da EEAV**

Os mecanismos para a diminuição do edema com o uso da EEAV são pouco estudados e baseiam-se em várias hipóteses. Uma das primeiras foi o fenômeno eletrofisiológico descrito por Alon e De Domenico<sup>47</sup>. Este fenômeno sugere que a EEAV(-) repele as proteínas plasmáticas carregadas negativamente, encontradas no interstício da área traumatizada. Este incremento na mobilidade acelera a drenagem das proteínas pelos capilares linfáticos facilitando o fluxo linfático e diminuindo o edema. Esta teoria foi comprovada parcialmente no estudo de Reed<sup>53</sup> que reportou que intensidades de 30 e 50 volts de EEAV(-), diminuem a permeabilidade às macromoléculas, retardando muito a formação do edema, principalmente na fase aguda.

Outra hipótese sobre os possíveis mecanismos pelos quais a EEAV(-) contribui para a diminuição do edema é o estímulo do fluxo linfático que produz aumento da pressão intersticial, facilitando a drenagem e a diminuição do edema<sup>42,43,47</sup>. Cook<sup>54</sup>, baseado na hipótese de Alon e De Domenico, indica que a EEAV(-) facilita o transporte da albumina aumentando seu movimento, o qual estimula a abertura do lúmen linfático e promove a contração do músculo liso, permitindo ainda mais o movimento da albumina. Karnes<sup>49</sup> propôs duas hipóteses: que a EEAV(-) produz contração do músculo liso que rodeia os vasos

sanguíneos diminuindo o diâmetro das arteríolas; que a EEAV(-), por ser polarizada, gera acúmulo de carga elétrica, que altera o pH e diminui o edema.

Taylor<sup>48</sup> também relatou que a EEAV catódica reduziu o diâmetro das arteríolas, diminuindo o fluxo sanguíneo. Sua hipótese foi que a corrente influencia a magnitude de liberação da histamina das células ou afeta os sítios de ligação da histamina aos seus receptores nas vênulas pós-capilares das células endoteliais. Outra possibilidade é que a EEAV(-) reduza o cálcio no citosol e iniba a modificação da forma das células endoteliais para gerar as lacunas. Não entanto, até o momento não se conhece realmente a molécula ou tecido que seja afetado pela EEAV.

## REFERÊNCIAS

1. Michlovitz SL. Thermal Agents in Rehabilitation. 3 ed. Philadelphia. F.A. Davis Company. 1996;30-54.
2. Cotran RS, Kumar V, Robbins S, Schoen FJ. Patologia Estrutural e Funcional Robbins. 7 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2000;43-83.
3. Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel M, Malik AB. Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol.* 2002;117:105–112.
4. O’Sullivan S, Schmitz TJ. Physical Rehabilitation: Assessment and Treatment. 3 ed. F.A. Davis Company. Philadelphia. 1994.
5. Michel CC, Curry FE. Microvascular Permeability. *Physiol Rev.* 1999;79,3: 704-761.
6. Griffin JW, Newsome LS, Stralka SW, Wright PE. Reduction of chronic posttraumatic hand edema: a comparison of high voltage pulsed current, intermittent pneumatic compression, and placebo treatments. *Phys Ther.* 1990;70, 5:279-286.
7. Huang ZL, Mochizuki T, Watanabe H, Maeyama K. Activation of sensory nerves participates in stress-induced histamine release from mast cells in rats. *Neurosci Lett.* 1999;270:181-184.
8. MacGlashan, D. Histamine: a mediator of inflammation. *J allergy Clin Immunol.* 2003;112:S53- S59.
9. Hinsbergha VW, Nieuw GP. Endothelial hyperpermeability in vascular leakage. *Vascul Pharmacol.* 2003;39: 171– 172.
10. Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. Role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol.* 2003;39: 173–185.
11. Duffy TC, Kirby R, Dacvecc D, Rudloff E. State of the art review. Critical role of the vascular endothelial cell in health and disease: a review article. *J Vet Emerg Critical Care.* 2004;14,2: 84-99.
12. Evans TW. Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16 (Suppl. 5): 6-11.
13. Prado-Fernández J, Rodriguez-Vázquez JA, Tojob E, Andrade JM. Quantitation of  $\kappa$ ,  $\lambda$ - and  $\iota$  carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. *Anal Chim Acta.* 2003;480: 23–37.
14. De Ruyter GA, Rudolph B. Carrageenan biotechnology. *Trends Food Sci Technol.* 1997;8: 389-395.

15. Ferreira FR. Estudo comparativo de carragenanas comerciais kappa, iota e lambda no processo inflamatório em ratos: edema intraplantar e pleuresia. Tese de doutorado: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2005.
16. Nishikori T, Irie K, Suganuma T, Ozaki M, Yoshioka T. Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *Europ J Pharmacol.* 2002; 451:327– 333.
17. Sluka KA, Westlund KN. Behavioral and immunohistochemical changes in the experimental arthritis model in rats. *Pain.* 1993; 55:367-377.
18. Nantel, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M. Metters, K.M., Chan, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol.* 1999; 128: 853 - 859.
19. Hong SK, Han JS, Min SS, Hwang JM, Kim YI, Na HS, Yoon YW, Han HC. Local neurokinin-1 receptor in the knee joint contributes to the induction, but not maintenance, of arthritic pain in the rat. *Neurosci Lett.* 2002; 322:21–24.
20. Lawanda, N. B., Mcnearneyb, T., Westlunda, K.N. Amino acid release into the knee joint: key role in nociception and inflammation. *Pain;* 2000; 86:69-74.
21. Tan-No K, Nakajima T, Shoji, T. Nakagawasai O. Nijjima F. Anti-inflammatory Effect of Propolis through Inhibition of Nitric Oxide Production on Carrageenin-Induced Mouse Paw Edema. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29,1:96-99.
22. Hargreaves, K. Dubner, R. Brown, F. Flores, C. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.*1988;32:77-88.
23. Salvemini D, Wang Z, Wyatt PS, Bourdon DM. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan – induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol.* 1996; 118: 829 – 838.
24. Cicala C, Morello S, Alfieri A. et al. Haemostatic imbalance following carrageenan-induced rat paw oedema. *Europ J Pharmacol.* 2007;577:156-161.
25. Marabese I., Novellis V, Palazzo E, Scafuro MA, Vita D, Rossi F, Maione S. Effects of (S)-3,4-DCPG, an mGlu8 receptor agonist, on inflammatory and neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology.* 2007; 52. 253-262.
26. Sluka KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, Eshcol JO. ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain.* 2007;129:102-112.
27. Sluka KA, Bailey K, Bogush J, Olson R, Ricketts A. Treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint. *Pain.* 1998; 77:97–102.

28. Omar ME, Abdel S. Modulation of inflammatory paw oedema by cysteamine in the rat. *Pharmacol Res.* 2002;45, 4: 275-284.
29. Ueno A, Naraba H, Ikeda Y, Ushikubi F. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in ip-receptor-deficient mice. *Life Sci.* 2000.66, 12: PL 155-160.
30. Kehla J, Trempea TM, Hargreaves KM. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. *Pain.* 2000; 85: 333-343.
31. Sammons MJ, Raval P, Davey PT, Rogers D, Parsons AD, Bingham S. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res.* 2000; 876: 48–54.
32. Schaible H, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain.* 1993; 55:5-54.
33. Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain.* 1993;54:241 – 289.
34. Sluka KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, Eshcol JO, Price MP. ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain.* 2007;129:102-112.
35. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003;104: 567–577.
36. Santer V, Sriratana A, Lowther DA. Carrageenin-induced arthritis:V. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1983;13:160-168.
37. Hansra P, Moran EL, Fornasier VL, Bogoch ER. Carrageenan-induced arthritis in the rat. *Inflammation* 2000;24:141-155.
38. Gillard GC, Lowther DA. Carrageenin-induced arthritis II. Effect of intraarticular injection of carrageenin on the synthesis of proteoglycan in articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 1976;19:918-922.
39. Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Clinical Electrotherapy.* 3 ed. Appleton & Lange. USA. 1999;55-139.
40. Davini R, Nunes CV, Guirro ECO, Guirro RRJ. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Rev Bras Fisioter.* 2005;9:249-256.
41. Bettany JA, Fish DL, Mendel FC. Influence of high voltage pulsed direct current on edema formation following impact injury. *Phys Ther.* 1990;70, 4:219-224.

42. Taylor K, Fish DR, Mendel FC, Burton HW. Effect of a single 30-minute treatment of high voltage pulsed current on edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther.* 1992;72,1: 63-68.
43. Mohr TM, Akers TK, Landry RG. Effect of high voltage stimulation on edema reduction in the rat hind limb. *Phys Ther.* 1987;67, 11: 1703-1707.
44. Thorton RM, Mendel FC, Fish DL. Effects of electrical stimulation on edema formation in different strains of rats. *Phys Ther.* 1998;78, 4: 386 – 394.
45. Dolan MG, Graves P, Nakazawa C, Delano T, Hutson A, Mendel FC. Effects of ibuprofen and high-voltage electric stimulation on acute edema formation after blunt trauma to limbs of rats. *J Athl Train.* 2005;40,2: 111-115.
46. Dolan MG, Mychaskiw AM, Mendel FC. Cool-water immersion and high-voltage electric stimulation curb edema formation in rats. *J Athl Train.* 2003;38, 3: 225 -230.
47. Cosgrove KA, Alon G, Bell SF, Fisher SR. The electrical effect of two commonly used clinical stimulators on traumatic edema in rats. *Phys Ther.* 1992;72,3: 227- 233.
48. Taylor K, Mendel FC, Fish DR, Hard R, Burton HW. Effect of high-voltage pulsed current and alternating current on macromolecular leakage in hamster cheek pouch microcirculation. *Phys Ther.* 1997;77, 12: 1729 -1740.
49. Karnes JL, Mendel FC, Fish DR, Burton HW. High-Voltage Pulsed Current: Its Influence on Diameters of Histamine-Dilated Arterioles in Hamster Cheek Pouches. *Arch Phys Med Rehabil.* 1995;76: 381-386.
50. Fish DR, Mendel FC, Schultz AM, Gottstein-Yerke LM. Effect of anodal high voltage pulsed current on edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther.* 1991;71,10: 724- 733.
51. Taylor K, Fish DR, Mendel FC, Burton HW. Effect of electrically induced muscle contractions on posttraumatic edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther.* 1992;72,2: 127-132.
52. Man IOW, Morrissey MC, Cywinski JK. Effect of neuromuscular electrical stimulation on ankle swelling in the early period after ankle sprain. *Phys Ther.* 2007;87, 1: 53 – 65.
53. Reed BV. Effect of high voltage pulsed electrical stimulation on microvascular permeability to plasma proteins. A possible mechanism in minimizing edema. *Phys Ther.* 1988;68, 4:491-495.
54. Cook HA, Morales M, La Rosa EM, Dean J, Donnelly MK, Mchugh P. Effects of electrical stimulation on lymphatic flow and limb volume in the rat. *Phys Ther.* 1994;74,11:1040 – 1046.
55. Mendel FC, Fish DR. New Perspectives in Edema Control via Electrical Stimulation. *J Athl Train.* 1993;28,1:63-74.

### 3. MANUSCRITO 1

Manuscrito submetido à Revista Brasileira de Fisioterapia.

#### **EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DE ALTA VOLTAGEM NUMA ETAPA INICIAL NO ENTORSE DE TORNOZELO**

SANDOVAL MC<sup>1</sup>, RAMIREZ C<sup>2</sup>, CAMARGO DM<sup>1</sup>, SALVINI TF<sup>3</sup>.

1. Professora Associada, Escuela de Fisioterapia, Universidad Industrial de Santander - Bucaramanga (Santander), Colômbia.
2. Professora de Cátedra, Escuela de Fisioterapia, Universidad Industrial de Santander - Bucaramanga (Santander), Colômbia.
3. Professora Titular, Unidade de Plasticidade Muscular, Laboratório de Neurociências, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos (SP), Brasil.

Correspondência para:

Maria Cristina Sandoval

Carrera 32 No.29-31

Facultad de Salud – Escuela de Fisioterapia -Universidad Industrial de Santander  
Bucaramanga (Santander), Colômbia.

E-mail: [sandoval@uis.edu.co](mailto:sandoval@uis.edu.co)

TÍTULO CURTO: Efeito da estimulação elétrica no entorse

PALAVRAS CHAVES: estimulação elétrica, entorse, inflamação.

## RESUMO

**Contexto:** A eficácia da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) em humanos como uma forma de tratamento para controlar o edema e a dor pós-traumáticos ainda não foi estabelecida.

**Objetivo:** analisar o efeito da EEAV no pós- entorse de tornozelo em humanos.

**Métodos:** ensaio clínico controlado e aleatorizado, duplo cego com três grupos de intervenção: (GC), grupo controle com fisioterapia convencional; EEAV(-) fisioterapia convencional e EEAV polaridade negativa; EEAV(+) fisioterapia convencional e EEAV polaridade positiva. Vinte e oito portadores de entorse lateral do tornozelo (2 a 96h pós-trauma) foram avaliados. O tratamento convencional consistiu de crioterapia (20min) e exercício terapêutico. Adicionalmente, os grupos EEAV(-) e EEAV(+) receberam 30min de estimulação elétrica (nível submotor, 120pps). As variáveis de dor, edema, amplitude de movimento (ADM) e marcha foram avaliadas antes da primeira sessão de tratamento e após a última sessão de tratamento.

**Resultados:** Na avaliação final não houve diferenças significativas entre os três grupos. Porém foi encontrada melhora clínica em todos os parâmetros de avaliação, principalmente no EEAV (-). A análise dos dados mostrou que o EEAV(-) apresentou maior redução do volume e do perímetro, maior recuperação da ADM e da cadência da marcha. Esse grupo também alcançou o término de tratamento mais rápido (1,7 semanas [1,2 – 2,2]), comparado com o EEAV (+) e GC (2,2 semanas [1,8 – 2,6]).

**Conclusões:** Não houve diferença entre os grupos estudados, mas os resultados sugerem que a EEAV(-) pode contribuir para acelerar a recuperação do entorse de tornozelo em sua fase inicial.

Registro NTC 00732017 – [clinical trials.gov](http://clinicaltrials.gov)

## ABSTRACT

**Background:** The effectiveness of high voltage pulse current (HVPC) treatment in humans to control the swelling and the posttraumatic pain has not yet been established.

**Objective:** To analyze the effect of HVPC on ankle sprain in humans.

**Methods:** randomized controlled double-blinded clinical trial with three groups: (CG) control group with standard physiotherapy; HVPC(-) standard physiotherapy and HVPC negative polarity; HVPC(+) standard physiotherapy and HVPC positive polarity. Twenty-eight patients with lateral ankle sprains (2 to 96h post trauma) were evaluated. The standard physiotherapy was cryotherapy (20min) and therapeutic exercises. Additionally, both HVPC (-) and HVPC(+) received 30min of electrical stimulation, (submotor level, 120pps). Pain, edema, range of motion (ROM) and gait were assessed before the first treatment and after the last session treatment.

**Results:** At the final evaluation there were not significant differences among the three groups. Nevertheless clinical improvement was detected in all parameters evaluated, mainly in HVPC(-). Data analysis showed that HVPC(-) had greater reduction in the volume and girth, and major recovery of ROM and the gait speed. This group also reached the end point faster (1.7 weeks [1.2 – 2.2]), than HVPC(+) and CG (2.2 weeks [1.8 - 2.6]) groups.

**Conclusions:** There was not difference between the study groups, but the results suggest that HVPC

(-), could contribute to accelerate the recovery of ankle injury in its initial phase.

**Key Words:** electrotherapy, sprain, swelling

Registration NTC 00732017 – clinical trials.gov

## INTRODUÇÃO

O entorse do tornozelo é uma lesão musculoesquelética caracterizada por dor, edema e limitação da amplitude de movimento (ADM). Consiste no dano do ligamento, o qual baseado nos sintomas é classificado em três tipos, associados com a severidade da lesão<sup>1,2</sup>. Este trauma apresenta uma alta frequência na população; numa revisão sistemática recente<sup>3</sup>, que avaliou 227 estudos epidemiológicos de prevalência de lesões esportivas, foi identificado que o tornozelo foi a região mais lesada em 24 de 70 esportes e que os entorses de tornozelo foram a lesão predominante em 33 de 43 esportes. Também a maior parte dos estudos epidemiológicos<sup>3,4</sup> assinalam que os entorses laterais de tornozelo correspondem a 95% das lesões dessa articulação.

Inicialmente o entorse de tornozelo apresenta os sinais típicos de um processo inflamatório. Um deles é o edema, que se caracteriza por uma excessiva quantidade de líquido acumulado nos espaços intersticiais dos tecidos<sup>1</sup>. Este sinal produz dor e pode tornar mais lento ou dificultar a troca de nutrientes entre células e capilares, retardando o processo de cicatrização. O acúmulo de líquido pela estase piora o processo inflamatório, que pode resultar na morte das células, com conseqüente necrose tecidual. Também pode gerar um maior período de imobilização, fibrose, aderências e finalmente, rigidez da estrutura<sup>5</sup>.

Embora a Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) seja um dos recursos terapêuticos utilizados no tratamento do edema e dor pós-traumático<sup>6</sup>, sua efetividade em humanos não foi ainda comprovada. Este tipo de corrente se caracteriza por ter um pulso monofásico pico duplo, gerando uma voltagem maior do que 150V, apesar de ter uma corrente total baixa (1.5mA), com uma duração de pulso muito curta (5 – 100µs) e intervalos interpulsos grandes. Estas características permitem que a EEAV gere pouca ou nenhuma reação eletroquímica entre a pele e os eletrodos de estimulação, provocando uma sensação confortável. Este tipo de estimulação elétrica também tem sido utilizada na cicatrização de feridas e pela curta duração do pulso não é a mais indicada para ser aplicada em músculos desnervados<sup>6</sup>.

A maioria dos estudos realizados para investigar os efeitos da EEAV sobre o edema foram feitos em animais e, só identificamos um em humanos<sup>5</sup>. Nesse estudo clínico<sup>5</sup>, compararam-se os efeitos de três intervenções terapêuticas (EEAV(-), placebo da EEAV e a compressão pneumática intermitente) no tratamento do edema crônico pós-traumático da mão. Os autores não encontraram diferença estatística entre a EEAV(-) e a compressão, mas sim

uma maior diminuição do edema no grupo tratado com EEAV(-), comparado ao grupo placebo.

Nos estudos em animais, os resultados de Bettany et al.<sup>7</sup> e Taylor et al.<sup>8</sup> observaram diminuição do edema nas patas traumatizadas de rãs tratadas com EEAV (75  $\mu$ s, 120pps, intensidade num nível submotor, polaridade negativa). Mohr et al.<sup>9</sup> também fizeram um trabalho experimental em patas traumatizadas de ratos, aplicando uma frequência de 80pps e uma duração do pulso de 35 $\mu$ s, no qual se observou uma grande diminuição do edema, mas sem diferença em relação ao grupo controle traumatizado e não tratado.

Dolan et al.<sup>10,11</sup> realizaram alguns estudos sobre o efeito da EEAV no edema pós-traumático agudo. Em um dos estudos<sup>10</sup> compararam o efeito do ibuprofeno com a EEAV(-) sobre o edema pós traumático em patas de rãs, aplicando corrente por 3 horas contínuas, com intensidade de 90% do nível motor e 120pps. Os resultados mostraram diminuição do edema nos três grupos (ibuprofeno; EEAV(-); ibuprofeno + EEAV(-)) depois das intervenções, quando comparado ao grupo não tratado. No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos. Resultados similares foram encontrados num estudo no qual compararam os efeitos da EEAV(-) e da crioterapia no tratamento do edema pós-traumático<sup>11</sup>.

Pode-se observar nos estudos anteriores que alguns parâmetros como tipo de corrente, polaridade, tempo de aplicação e nível de estimulação são importantes e devem ser considerados durante o tratamento para que a EEAV seja eficiente na redução do edema. Na revisão da literatura são encontrados vários estudos mostrando resultados negativos com polaridade positiva<sup>14</sup> e nível de estimulação motor<sup>15,16</sup>. Também não houve diminuição do edema quando utilizada a corrente alternada<sup>12</sup> ou de baixa voltagem<sup>13</sup>. Essa discrepância de resultados pode ser decorrente dos diferentes parâmetros da EEAV utilizados, dificultando também a comparação entre os estudos.

Os trabalhos revisados mostraram algumas das vantagens do uso da EEAV para controlar o edema, no entanto, não há resultados conclusivos do efeito dessa intervenção em humanos. A hipótese deste estudo é que a EEAV(-) acelera a resolução do processo inflamatório na fase inicial pós-entorse de tornozelo, assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da EEAV pós-entorse de tornozelo em humanos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi feito um ensaio clínico controlado duplo cego com três grupos de intervenção, seguindo as normas da declaração de Helsinki, aprovação previa do comitê de ética da Universidade (Parecer no. 5612/2003). Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de participação no estudo.

### **Amostra**

Vinte e oito sujeitos (18 homens, 10 mulheres), com idades entre 18 e 26 anos ( $21 \pm 2,5$  anos), foram avaliados e submetidos a tratamento fisioterapêutico no ambulatório de Fisioterapia da Universidade. Os critérios de inclusão foram: edema pós-traumático gerado por entorse de tornozelo classificado como grau leve (dor e limitação funcional mínimas, sem hematoma, marcha normal) ou moderado (marcha claudicante, edema localizado, perda funcional moderada)<sup>1,2</sup>, período pós entorse até 96 horas, sinais positivos para gaveta anterior, ou inclinação lateral na articulação do tornozelo<sup>1,2</sup>. Foram excluídos os sujeitos que apresentaram entorse severo (edema e hematoma severos, incapacidade para suportar peso e perda funcional total)<sup>1,2</sup>; portadores de afecções que pudessem interferir no edema e na dor (lesões cutâneas, alterações sistêmicas ou traumas prévios); indivíduos que estivessem realizando uso regular de antiinflamatórios ou que tenham sido submetidos a formas empíricas de tratamento como trações, massagens ou mobilizações manuais realizados por pessoal não qualificado.

Os grupos de tratamento foram distribuídos da seguinte forma:

- Grupo Controle (GC): recebeu tratamento de fisioterapia convencional.
- Grupo estimulação elétrica polaridade positiva (EEAV+): recebeu tratamento de fisioterapia convencional e EEAV usando os eletrodos ativos com polaridade positiva.
- Grupo estimulação elétrica polaridade negativa (EEAV-): recebeu tratamento de fisioterapia convencional e EEAV usando os eletrodos ativos com uma polaridade negativa.

Para evitar um possível erro de seleção na alocação dos tratamentos e garantir que os três grupos ficassem balanceados em suas características de base, foi feita uma alocação por blocos. Logo foi aleatorizada a ordem de entrada dos blocos por meio de tabela de números aleatórios e consecutivamente a alocação do tratamento aos pacientes<sup>17</sup>. As avaliações e as intervenções foram feitas, respectivamente, por duas fisioterapeutas treinadas, as quais não

tinham acesso à identificação dos grupos de tratamento, nem ao tipo de polaridade usada na EEAV.

## **Procedimento**

Foram analisadas as variáveis gênero, idade e membro dominante. Com relação aos antecedentes clínicos do entorse foram identificados os seguintes aspectos: membro comprometido, período pós-trauma (horas), o tipo de entorse (leve, moderado) e a causa. Foi também identificada a possível ingestão de analgésicos e os antecedentes de lesões prévias no tornozelo.

Foram consideradas as seguintes variáveis dependentes: dor, amplitude de movimento articular (ADM), edema e alguns parâmetros da marcha. A dor foi avaliada ao repouso, à palpação e aos quatro movimentos do tornozelo (dorsiflexão, plantiflexão, eversão e inversão) usando uma escala visual analógica (EVA) horizontal que vai de 0 até 10 cm, sendo 0 ausência de dor e 10 a pior dor sentida pelo indivíduo. Foi solicitado ao paciente que assinalasse o grau de dor na EVA e posteriormente a distância foi mensurada com uma régua, registrando o valor em cm. A EVA foi utilizada por ser um método com alta sensibilidade, validade e confiabilidade<sup>18</sup>.

O edema foi mensurado por meio da perimetria e volumetria. A primeira foi medida com uma fita métrica em duas regiões: ao redor do tornozelo sobre o extremo distal do maléolo lateral, e logo ao redor do pé na parte mais elevada do arco longitudinal interno<sup>19,20</sup>. Foi feita uma média entre as duas medidas de cada membro e logo se registrou a diferença entre os membros direito e esquerdo.

A mensuração volumétrica foi escolhida por ser considerada por alguns autores como padrão ouro para a medição do edema<sup>20</sup>. Conforme recomendado<sup>20</sup>, foi utilizado um tanque volumétrico com a saída do excesso da água para um cilindro graduado de 500ml. O sujeito foi orientado a sentar-se numa cadeira e introduzir lentamente o membro acometido na água com o joelho em 90° de flexão e o tornozelo em posição neutra, até apoiar completamente a superfície da planta do pé no fundo do tanque. O volume de água deslocada foi então mensurado no cilindro graduado. Em seguida, os mesmos procedimentos foram realizados no membro contralateral.

A ADM de flexão plantar e dorsal, inversão e eversão em ambos os tornozelos, foram mensurados com um goniômetro universal, seguindo o protocolo de Norkin e White<sup>21</sup>. Todos os movimentos começaram no ponto zero, ou seja, com o tornozelo formando 90 graus entre a

perna e o pé. Para a análise dos dados, foi utilizada a diferença entre as medidas dos tornozelos.

Finalmente, foram avaliadas algumas variáveis descritivas da marcha: comprimento do passo e da passada e a cadência<sup>22</sup>. Para isso, o paciente foi orientado a caminhar sobre um tapete preto onde foi registrada a marca da pegada para com a impressão da mesma mensurar o comprimento do passo e da passada; a cadência foi avaliada mediante o registro do número de passos por minuto<sup>22</sup>.

Os pacientes receberam tratamento fisioterapêutico uma vez ao dia, com cinco intervenções na semana em dias consecutivos até alcançar o término de tratamento ou pelas oito semanas previstas para o tratamento. Foram feitas duas avaliações: inicial, antes de começar o tratamento, e final, quando o indivíduo tinha condições para finalizar o tratamento de fisioterapia como está descrito a seguir.

### **Término do Tratamento**

Para determinar o final do tratamento, foram utilizados os valores mensurados na EVA. O final do tratamento foi definido como o tempo decorrido, em semanas, para alcançar um valor  $\leq 1$  cm na avaliação da dor ao movimento. Esta variável foi escolhida para determinar o fim do tratamento, porque a dor é considerada um processo multidimensional, associada a dano tecidual que afeta a capacidade funcional do sujeito<sup>23</sup>.

### **Intervenção terapêutica**

#### **Fisioterapia convencional**

Os indivíduos dos três grupos foram submetidos a um tratamento fisioterápico frequentemente recomendado pós-entorse<sup>24</sup>:

- Fase inicial: crioterapia (bolsa de gelo picado, 20min) envolvendo toda a articulação do tornozelo, associada à elevação do membro acometido, exercícios isométricos e ativos livres em todos os graus de liberdade da articulação do tornozelo, até os limites de dor, sem descarga de peso.
- Fase intermédia: Iniciada quando os movimentos ativos livres eram realizados sem dor. Foi mantida a crioterapia nesse período. Início de exercícios com carga progressiva, descarga de peso progressivo na marcha e exercícios proprioceptivos em superfícies estáveis.
- Fase avançada: Iniciada quando os indivíduos realizavam os exercícios resistidos sem dor. Foi realizado treino proprioceptivo em superfícies instáveis, fortalecimento com

facilitação neuromuscular proprioceptiva e bandas elásticas. Finalmente foram iniciadas atividades de corrida em S e Z e saltos em todas as direções.

### **Parâmetros da EEAV**

Foi utilizado um estimulador de alta voltagem (modelo Intellect 500, Chattanooga Corp, Chattanooga, TN), com uma corrente pulsada monofásica, pico duplo com uma duração de 5 e 8 $\mu$ s e separados por um intervalo interpulsátil de 75 $\mu$ s. Foi usada uma aplicação monopolar com um eletrodo dispersivo (13x20cm) colocado sobre a região lombar e dois eletrodos ativos transarticulares (4x5cm), fixados sobre os maléolos interno e externo do tornozelo. A intensidade da corrente foi no nível submotor, ou seja, antes de observar uma resposta motora visível. Foi escolhida esta intensidade baseada em estudos realizados em animais que apresentaram resultados positivos<sup>7,8,10,11,25</sup>; foi também considerado que os pacientes estavam numa fase aguda, e essa intensidade evitaria o risco de gerar contração muscular que pode aumentar o trauma. A polaridade utilizada dependeu do grupo no qual ficou cada paciente e a frequência usada foi de 120pps. A EEAV foi aplicada uma vez ao dia, com duração de 30min. O equipamento foi calibrado previamente à intervenção, utilizando-se um osciloscópio (Tektronix TDS 1002) para conferir os parâmetros escolhidos.

### **Análise Estatística**

A comparação entre os grupos de estudo, no início e no final da intervenção para a perimetria, volumetria, ADM, comprimento do passo e da passada tiveram como base a diferença entre os membros inferiores (acometido e não acometido); para a dor e a cadência da marcha foram analisados os valores obtidos no momento das avaliações inicial e final. Adicionalmente, estabeleceu-se a porcentagem de recuperação para o volume e o perímetro, calculada com a seguinte fórmula: Diferença inicial entre membros acometido e não acometido – diferença final entre membros acometido e não acometido x 100/diferença inicial entre membros acometido e não acometido. Para esta análise foi aplicado uma análise de variância (ANOVA) de uma via.

Para determinar o tempo médio até alcançar o término do tratamento aplicou-se uma análise de sobrevivência, onde suas funções por grupo de intervenção foram comparadas pelo teste de Wilcoxon.

A avaliação do efeito terapêutico da EEAV(-) e da EEAV(+), comparado ao grupo controle, foi feita por meio de análise multivariada aplicando o modelo de riscos proporcionais de Cox, para definir as taxas de risco (*Hazard Ratio* - HR). Cada HR estabelece a probabilidade de alcançar o término do tratamento num período de tempo determinado.

Este modelo permite ajustar o efeito da EEAV(-) e da EEAV(+), pelas variáveis que potencialmente poderiam afetar seus resultados como gênero e idade, assim como pelas variáveis registradas nos antecedentes clínicos do entorse.

Este modelo foi submetido às provas de diagnóstico ajustando com a análise de riscos proporcionais e o Teste de Link ( $p=0,89$ ), sendo posteriormente determinado o ajuste final da regressão<sup>26</sup>. Em todas as análises o nível de significância foi de  $p < 0,05$  e foram processadas no software STATA 9,0.

## RESULTADOS

As características de base como gênero, idade, membro dominante e antecedentes clínicos dos participantes foram homogêneos. Em 27 dos sujeitos (96,4%), o membro direito era o dominante, embora só 10 deles tenham sofrido a lesão neste membro. O período médio pós-entorse foi de  $31,4 \pm 17,6$ h para os três grupos, sem diferença entre eles. De modo geral, o trauma em inversão forçada foi a causa mais comum dos entorses (n=22), sendo esse o primeiro episódio de entorse da maioria dos indivíduos avaliados (n=17; Tabela 1).

**Tabela 1.** Antecedentes clínicos dos grupos de intervenção.

Variáveis	Grupo de Intervenção		
	Fisioterapia Convencional	Fisioterapia Convencional	Fisioterapia Convencional
	GC n:10	+ EEAV(+) n:8	+ EEAV(-) n:10
Idade (anos)*	21,3 ± 2,7	22,5 ± 2,5	20,3 ± 2,0
Membro dominante direito	10	8	9
Membro dominante comprometido	4	3	3
Período pós trauma (horas)*	29 ± 16,6	33,8 ± 21,7	32 ± 16,6
Causa da lesão			
Inversão forçada	10	5	8
Outras		3	2
Entorses prévias			
Primeira vez	7	5	5
Segunda vez	1	2	1
Mais de duas vezes	2	1	3

\*(Média ± DP)

Ao analisar as avaliações iniciais, não foram encontradas diferenças entre os grupos estudados, com exceção do ADM da flexão plantar ( $p=0,03$ ) (Tabela 2). Na avaliação final, não foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos, embora observou-se melhoria clínica em todos os parâmetros principalmente no EEAV(-). Encontrou-se um maior percentual de diminuição de volume e do perímetro nos indivíduos desse grupo, que também apresentaram maior recuperação da flexão plantar, flexão dorsal e eversão, assim como da cadência da marcha, quando comparado aos outros grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação inicial e final dos grupos de estudo.

Variáveis	Grupos de intervenção						P	
	Fisioterapia Convencional GC n:10		Fisioterapia Convencional + EEAV (+) n:8		Fisioterapia Convencional + EEAV (-) n:10			
	inicial	Final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
<b>Intensidade da dor- EVA (cm) *</b>								
Repouso	1,0 ± 1,6	0,03 ± 0,09	1,6 ± 2,8	0	0,8 ± 1,8	0	0,75	0,29
Palpação	5,8 ± 2,9	0,7 ± 0,84	5,6 ± 3,3	0,4 ± 0,6	6,9 ± 1,4	0,91 ± 0,91	0,53	0,41
Movimento	3,7 ± 2,2	0,6 ± 0,65	3,3 ± 1,4	0,19 ± 0,27	2,6 ± 2,2	0,71 ± 1,35	0,48	0,47
<b>Perimetria (cm)</b>								
Membro acometido	27,6	26,1	26,9	25,8	26,8	24,9		
Membro não acometido	26	25,7	24,7	25	25,1	24,7		
Diferença entre membros*	1,6 ± 0,9	0,4 ± 1,10	2,2 ± 1,7	0,8 ± 0,73	1,7 ± 0,9	0,2 ± 0,74	0,54	0,45
Porcentagem de recuperação		62,4		60,3		75,1		
<b>Volumetria (ml)</b>								
Membro acometido	1630,6	1567,7	1315,9	1255,1	1641,5	1535,5		
Membro não acometido	1515,2	1525,9	1150,5	1212,8	1521,3	1512,6		
Diferença entre membros*	115,4 ± 68,4	41,8 ± 52,4	165,4 ± 169,5	42,3 ± 76,0	120,2 ± 84,9	22,9 ± 18,5	0,60	0,66
Porcentagem de recuperação		66,5		70,0		81,0		
<b>ADM (graus)*</b>								
Flexão plantar	-13 ± 8,2	-6 ± 8,0	-2 ± 9,5	-1 ± 8,8	-6 ± 5,5	1 ± 5,5	0,03	0,20
Flexão dorsal	-6 ± 5,7	-1 ± 6,6	-3 ± 5,3	-1 ± 6,2	-4 ± 6,1	1 ± 4,4	0,49	0,83
Inversão	-10 ± 10,7	-3 ± 6,7	-1 ± 5,7	3 ± 8,0	-9 ± 13,9	2 ± 7,5	0,20	0,22
Eversão	-10 ± 7,0	-1 ± 7,0	-9 ± 9,3	-1 ± 6,5	-4 ± 8,6	4 ± 6,7	0,36	0,28
<b>Marcha*</b>								
Comprimento de passo (cm)	9,1 ± 7,7	2,6 ± 2,3	12,8 ± 10,5	1,1 ± 1,4	7,9 ± 5,5	1,6 ± 1,8	0,42	0,26
Comprimento da passada (cm)	12,7 ± 13,2	1,0 ± 1,25	18,1 ± 32,5	0,6 ± 0,88	7,8 ± 9,7	0,6 ± 1,26	0,56	0,70
Cadencia (passos/min)	94 ± 22,6	132 ± 21,2	89 ± 20	122 ± 15,1	104 ± 28,2	139 ± 27,5	0,43	0,28

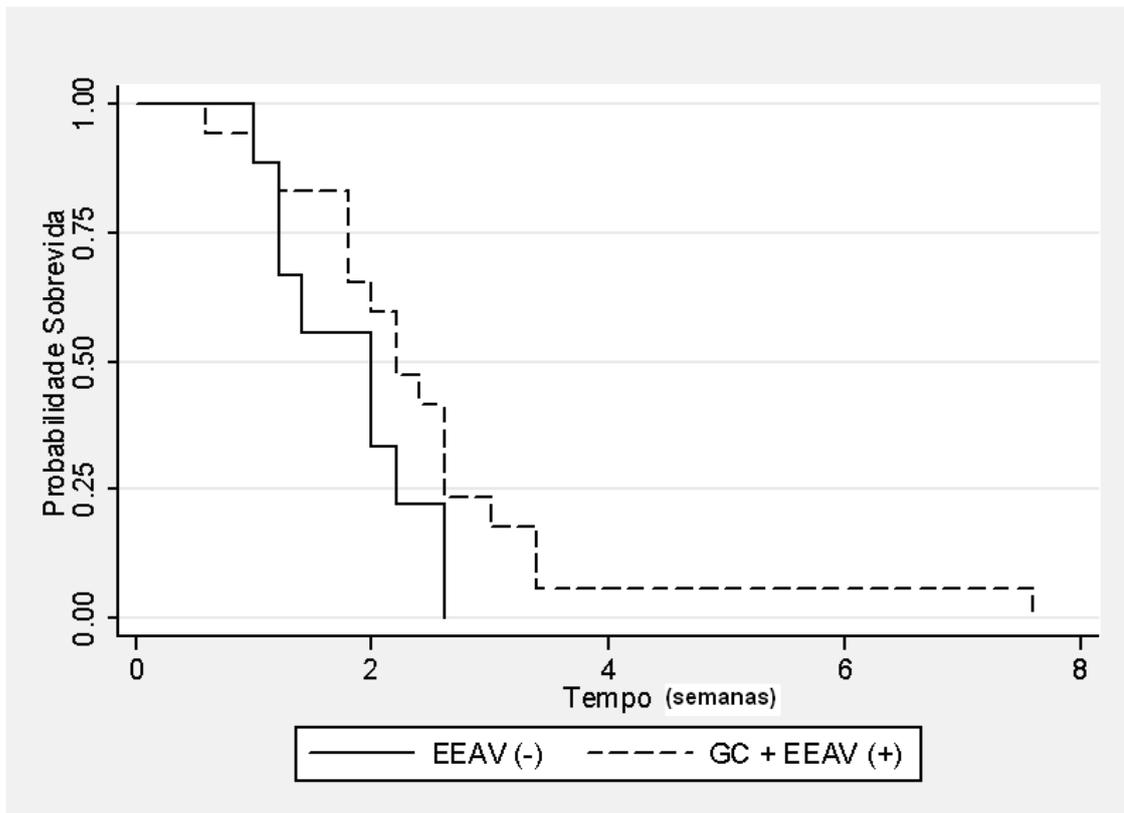
\* Média ± DP

† Porcentagem de recuperação: (Diferença inicial entre membros – diferença final entre membros \* 100)/ diferença inicial entre membros.

Edema, volumetria, ADM e os comprimentos de passo e da passada estão registrados como a diferença entre os membros acometido e não acometido.

O grupo EEAV(-) também apresentou menor tempo para recuperação (Mediana de sobrevida: 1,7 semanas [1,2 – 2,2], comparado ao EEAV(+) e GC (Mediana de sobrevida: 2,2 semanas [1,8 – 2,6], porém não houve diferença estatística entre os grupos. Os mesmos resultados foram confirmados pelo teste Wilcoxon-Breslow (1,75,  $p=0,42$ ).

O modelo de regressão de Cox mostrou que o grupo EEAV(-) aumentou significativamente a probabilidade de término de tratamento, com risco de 2,5 IC95% (1,02-6,4), quando comparado aos outros grupos (Figura 1). A única variável que diminuiu significativamente a probabilidade de alcançar o ponto final, foi o entorse tipo II que mostrou um HR de 0,36 IC95% (0,15-0,87).



**Figura 1.** Análise de riscos proporcionais da dor ao movimento. Observa-se que o EEAV(-) atinge mais rápido o término do tratamento.

## DISCUSSÃO

Neste estudo não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos estudados. No entanto, os resultados indicam diferenças que tem relevância desde a perspectiva clínica; de outro lado, o modelo de regressão mostrou que os grupos que receberam estimulação alcançaram o término de tratamento, mas os indivíduos do grupo EEVA(-) apresentaram menor tempo de recuperação. Provavelmente, o número de indivíduos examinados (n=28) tenha sido um fator limitante para a identificação de diferença estatística. Estes resultados preliminares sugerem que o EEAV(-) melhorou a evolução do processo inflamatório e o reparo tecidual, refletido na diminuição do edema, o aumento da ADM e melhora nos parâmetros da marcha, resultando numa recuperação mais rápida da funcionalidade.

Nossos resultados indicam que a EEAV(-) proporciona alguma vantagem clínica, quando comparada com a fisioterapia convencional (crioterapia e exercício), na recuperação dos sujeitos pós-entorse do tornozelo. Esses resultados coincidem com estudos prévios realizados em animais,<sup>7,8,10,11,25,27</sup> nos quais foi demonstrada a efetividade da EEAV(-) no tratamento do edema pós-traumático.

Estimulações elétricas com características diferentes, não têm reportado resultados positivos na diminuição do edema em animais, como foi demonstrado por Karnes et.al.<sup>13</sup>, ao utilizar corrente pulsada de baixa voltagem. Cosgrove et al.<sup>12</sup> compararam a corrente monofásica pulsada com a bifásica simétrica, encontrando que esta última apresentava menor diminuição do edema, comparado ao grupo controle. Taylor et al.<sup>28</sup> identificaram que somente a EEAV(-), mas não a corrente alternada, causou diminuição na saída de macromoléculas dos microvasos de capilares de hamsters com edema pós-traumático. Man et al.<sup>16</sup>, num estudo recente usaram corrente de baixa voltagem para tratar o edema de tornozelo em humanos, mas também não reportaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

O nível de estimulação selecionado em nosso estudo foi submotor para evitar a contração dos músculos e um possível estresse mecânico no local, que pudessem ampliar a lesão tecidual. A diminuição do edema utilizando esta intensidade, tem sido demonstrado em vários estudos com animais<sup>7,8,10-11,25,27,28</sup>. Um outro estudo que usou a corrente no nível motor, no tratamento de entorse de tornozelo (fase aguda) em humanos, não observou diferença entre o grupo tratado e o controle<sup>16</sup>. A comparação entre os resultados desses

estudos é difícil, pois além de usarem níveis de estimulação diferentes, também foram realizados em grupos distintos (animais e humanos).

No presente estudo foi utilizado um período de 30 min de aplicação da EEAV. Este período foi escolhido para mimetizar o que geralmente é feito na clínica. No entanto, talvez um período de estimulação maior pudesse ser melhor para a redução do edema, tal como demonstrado por Bettany et al.<sup>7</sup>, em animais. Taylor et al.<sup>8</sup>, também sugerem que o tratamento aplicado em humanos é pouco agressivo para reduzir o edema. Em seu trabalho com rãs eles encontraram que a EEAV(-) mantinha seu efeito somente entre 4 e 7,5 horas pós-tratamento. Dolan<sup>29</sup> e Mendel<sup>30</sup> também sugerem que deveria ser aumentado o tempo de aplicação da EEAV(-) durante a fase aguda pós-trauma para obtenção de melhores resultados. Outro aspecto assinalado é a necessidade de iniciar o tratamento pós-trauma com a EEAV(-) o mais cedo possível, para evitar o aumento do edema, pois uma vez estabelecido, sua redução fica mais difícil. Este fator pode ter influenciado os resultados obtidos no nosso estudo, uma vez que os indivíduos só iniciavam a terapia algumas horas (2-96h) pós-entorse.

A polaridade tem demonstrado ser um parâmetro que influencia a redução do edema. A polaridade negativa tem se mostrado mais efetiva, na maioria dos estudos analisados<sup>8,10,11,25,27,28</sup>, diferente de um estudo que selecionou o ânodo como eletrodo ativo<sup>14</sup>. Esse efeito foi também observado no presente estudo, onde o grupo que utilizou EEAV(-) apresentou maior porcentagem de diminuição do edema e também maior probabilidade de alcançar a alta clínica mais rapidamente.

Até o momento não se conhece o mecanismo fisiológico pelo qual a polaridade negativa atua no edema. Uma das hipóteses foi proposta por Alon e De Doménico<sup>12</sup>. Eles sugerem que a condução da corrente elétrica, com polaridade negativa através dos tecidos, desloca ou repele as proteínas plasmáticas carregadas negativamente, localizadas no interstício das áreas traumatizadas, fenômeno conhecido como cataforese. Esta proposta é polêmica e foi rejeitada por Mendel e Fish<sup>30</sup>, que acreditam que o fenômeno do campo elétrico ou polar não se produz com a EEAV(-), devido à curta duração do pulso.

No presente estudo a comparação das diferenças de cada um dos parâmetros avaliados por grupo de tratamento, não permitiu evidenciar diferenças significativas, o que talvez seja decorrência do tamanho da amostra, que pode ser considerado uma limitação deste estudo. Neste aspecto, influíram os estritos critérios de inclusão estabelecidos, com o propósito de homogeneizar as características dos participantes. Outro aspecto que pode ter influenciado os resultados foi a aplicação prévia do frio o qual pode ter diminuído a velocidade de condução<sup>31</sup> não permitindo agir de forma ótima a estimulação elétrica.

Embora este trabalho possa ser considerado um estudo preliminar, seus resultados indicam que pesquisas subseqüentes seriam importantes para obter mais informações sobre os efeitos da EEAV pós-trauma. Assim, futuros estudos poderiam ser feitos com maior número de indivíduos, períodos maiores de aplicação e variação da intensidade da EEAV.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os três grupos mas sugerem uma possível contribuição da estimulação elétrica de alta voltagem com polaridade negativa no entorse de tornozelo em humanos, acelerando a recuperação na fase inicial.

## REFERÊNCIAS

- 1- Mangwani J, Hakmi MA, Smith TWD. Chronic lateral ankle instability: review of anatomy, biomechanics, pathology, diagnosis and treatment. *Foot*. 2001;11:76-84.
- 2- Otter SJ. The conservative management of lateral ankle sprains in the athlete. *Foot*. 1999;9:12-17.
- 3- Fong DT, Hong Y, Chan L, Yung PS, Chan K. A systematic review on ankle injury and ankle sprain in sports. *Sports Med*. 2007;37:73-94.
- 4- Almeida SA, Williams KM, Shafferm RA, Brodine SK. Epidemiological patterns of musculoskeletal injuries and physical training. *Med Sci in Sports Exerc*. 1999;31(8):1176-1182.
- 5- Griffin JW, Newsome LS, Stralka SW, Wright PE. Reduction of chronic posttraumatic hand edema: a comparison of high voltage pulsed current, intermittent pneumatic compression, and placebo treatments. *Phys Ther*. 1990;70:279-286.
- 6- Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Clinical Electrotherapy*. USA: Appleton & Lange; 1999:55-139.
- 7- Bettany JA, Fish DL, Mendel FC. Influence of high voltage pulsed direct current on edema formation following impact injury. *Phys Ther*. 1990;70:219-224.
- 8- Taylor K, Fish DR, Mendel FC, Burton HW. Effect of a single 30-minute treatment of high voltage pulsed current on edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther*. 1992;72:63-68.
- 9- Mohr TM, Akers TK, Landry RG. Effect of high voltage stimulation on edema reduction in the rat hind limb. *Phys Ther*. 1987;67:1703-1707.
- 10- Dolan MG, Graves P, Nakazawa C, Delano T, Hutson A, Mendel FC. Effects of ibuprofen and high-voltage electric stimulation on acute edema formation after blunt trauma to limbs of rats. *J Athl Train*. 2005;40:111-115.
- 11- Dolan MG, Mychaskiw AM, Mendel FC. Cool-water immersion and high-voltage electric stimulation curb edema formation in rats. *J Athl Train*. 2003;38:225 -230.
- 12- Cosgrove KA, Alon G, Bell SF, Fisher SR. The electrical effect of two commonly used clinical stimulators on traumatic edema in rats. *Phys Ther*. 1992;72:227- 233.
- 13- Karnes JL, Mendel FC, Fish DR. Effects of low voltage pulsed current on edema formation in frog hind limbs following impact injury. *Phys Ther*. 1992;72:273-278.
- 14- Fish DR, Mendel FC, Schultz AM, Gottstein-Yerke LM. Effect of anodal high voltage pulsed current on edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther*. 1991;71:724-733.

- 15- Taylor K, Fish DR, Mendel FC, Burton HW. Effect of electrically induced muscle contractions on posttraumatic edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther.* 1992;72:127-132.
- 16- Man IOW, Morrissey MC, Cywinski JK. Effect of neuromuscular electrical stimulation on ankle swelling in the early period after ankle sprain. *Phys Ther.* 2007;87:53-65.
- 17- Zelen M. The randomization and stratification of patients to clinical trials. *J Chron Dis.* 1974;27:365-75.
- 18- MC Dowell J, Newell C. *Measuring Health. A guide to rating scales and questionnaires.* New York: Oxford University Press; 1996:335-379.
- 19- Whitney SL, Mattocks L, Irrgang J. Reliability of lower extremity girth measurements and right and left side differences. *J Sport Rehabil.* 1995;4:108-115.
- 20- Karges JR, Mark BE, Stikeleather SJ, Worrell TW. Concurrent validity of upper-extremity volume estimates: comparison of calculated volume derived from girth measurements and water displacement volume. *Phys Ther.* 2003;83:134-145.
- 21- Norkin C, White J. *Measurement of joint motion. A guide to goniometry.* 2 ed. Philadelphia: F.A. Davis; 1995:147-149.
- 22- Malanga G, Delisa JA. Clinical observation. *RRDS Gait Analysis in the Science of Rehabilitation.* 1-9.
- 23- Merskey H, Bogduk N. Part III: Pain terms; A current list with definitions and notes on usage. In: [Classification of chronic pain](#) syndromes and definitions of pain terms. Seattle: IASP Press; 1994: 209-214. Second edition.
- 24- Knight KL. *Cryotherapy in sport injury management.* Champaign: Ed. Human Kinetics; 2000:85-98.
- 25- Thornton RM. Effects of electrical stimulation on edema formation in different strains of rats. *Phys Ther.* 1998;78:386-394.
- 26- Kleinbaum DG. *Survival Analysis A self-learning text. Statistical in Health Sciences.* New York: Springer-Verlag; 1996.
- 27- Mendel FC, Wylegala JA, Fish DR. Influence of high voltage pulsed current on edema formation following impact injury in rats. *Phys Ther.* 1992;72:668-673.
- 28- Taylor K, Mendel FC, Fish DR, Hard R, Burton HW. Effect of high-voltage pulsed current and alternating current on macromolecular leakage in hamster cheek pouch microcirculation. *Phys Ther.* 1997;77:1729-1740.
- 29- Dolan MG, Mendel FC. Clinical Application of Electrotherapy. *Athl Ther Today.* 2004;9:11-16.

30- Mendel FC, Fish DR. New Perspectives in Edema Control via Electrical Stimulation. J Athl Train. 1993;28:63-74.

31- Algafly AA, George KP. The effect of cryotherapy on nerve conduction velocity, pain threshold and pain tolerance. Br J Sports Med. 2007;41:365-369.

#### 4. MANUSCRITO 2

Artigo submetido em periódico internacional indexado A (Journal of Athletic Training)

### **ESTIMULAÇÃO ELETRICA DE ALTA VOLTAGEM NOS NIVEIS SÉRICOS DE ALBUMINA E HISTAMINA NA INFLAMAÇÃO AGUDA DE TORNOZELO DE RATOS**

M.S. SANDOVAL MARIA CRISTINA<sup>1</sup>, M.Sc. RAMIREZ CAROLINA<sup>2</sup>, M.S. CAMARGO DIANA MARINA<sup>3</sup>, Ph.D. RUSSO THIAGO LUIZ<sup>4</sup>, Ph.D. SALVINI TANIA DE FATIMA<sup>5</sup>.

1. Professora Associada, Escuela de Fisioterapia, Universidad Industrial de Santander - Bucaramanga (Santander), Colômbia. E-mail: sandoval@uis.edu.co
2. MS. em Fisioterapia, Laboratório de Neurociências, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos (SP), Brasil. fisiocar@yahoo.es
3. Professora Associada, Escuela de Fisioterapia, Universidad Industrial de Santander - Bucaramanga (Santander), Colômbia. dcamargo@uis.edu.co
4. Ph.D. em Fisioterapia, Laboratório de Neurociências, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos (SP), Brasil. thiago\_russo@yahoo.com.br
5. Professora Titular, Unidade de Plasticidade Muscular, Laboratório de Neurociências, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos (SP), Brasil. tania@power.ufscar.br

Correspondência para:

Maria Cristina Sandoval

Carrera 32 No. 29-31

Facultad de Salud – Escuela de Fisioterapia -Universidad Industrial de Santander  
Bucaramanga (Santander), Colômbia.

E-mail: [sandoval@uis.edu.co](mailto:sandoval@uis.edu.co)

## RESUMO

**Contexto e objetivo:** o possível mecanismo pelo qual a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) atua na redução do edema ainda não se conhece. O propósito deste estudo foi avaliar o efeito da EEAV com polaridade negativa (-) aplicada no tornozelo de ratos com inflamação articular aguda.

**Métodos:** sessenta e quatro ratos Wistar foram divididos em quatro grupos similares (n=16): *inflamado+EEAV(-)*, aplicação de 0,03ml de *t*-carragenina (3%) na articulação tibio-társica e EEAV(-); *inflamado+EEAV placebo*, aplicação de carragenina e EEAV placebo; *normal +EEAV(-)*, aplicação de EEAV(-); *controle normal*, sem intervenção. EEAV(-) 100Hz em um nível submotor foi aplicada 45min por sessão durante 3 dias.

**Mensurações:** As variáveis foram dor, volume, e níveis séricos de histamina e albumina avaliadas antes e durante as 48 horas pós inflamação. As variáveis foram comparadas pelo teste t de *student*, ANOVA *one way*, ANOVA de medidas repetidas nested e teste de Bonferroni *post hoc*. Foi definido um nível  $\alpha < 0,05$ .

**Resultados:** Não houve diferença entre os grupos *inflamado+EEAV(-)* e *inflamado+EEAV placebo* nos parâmetros de dor e edema ( $p > 0,05$ ). Houve diminuição da albumina nos grupos que receberam intervenção, mas sem diferença entre eles. Em relação à histamina só houve aumento 24h nos grupos *normal +EEAV(-)* ( $p = 0,0001$ ) e *inflamado+EEAV placebo* ( $p = 0,01$ ) comparado ao grupo *controle normal*.

**Conclusões:** Os resultados deste trabalho indicam que a EEAV(-) nos parâmetros utilizados não diminuiu a dor e o edema, nem alterou os níveis séricos de albumina e histamina, sugerindo ausência de efetividade desse recurso no tratamento da inflamação articular aguda.

**PALAVRAS CHAVES:** estimulação elétrica, entorse, inflamação, albumina, histamina.

## ABSTRACT

**Objective:** The probable mechanism by which high-voltage electrical stimulation (HVPC) act on edema reduction is unknown. The purpose of this study was to assess the effect of HVPC with negative polarity (-) applied to the ankle of rats with acute joint inflammation.

**Design and setting:** the 64 rats were divided into four similar groups (n=16): *inflamed+HVPC(-)*, 0.03 ml application of *t*-carragenina (3%) to the tibiotarsal joint and HVPC(-); *inflamed+HVPC placebo*, carragenina application and HVPC placebo; *normal +HVPC(-)*, HVPC application(-); *normal control*, with no intervention. The HVPC(-) 100Hz in a submotor level was applied daily for 45min per session for 3 days.

**Subjects:** We used sixty-four Wistar rats in this study.

**Measurements:** The variables were pain, hind-foot volume, levels of serum histamine and albumin assessed before and during the 48 hours following inflammation. The variables were compared using the *t* test, one-way ANOVA, nested ANOVA for repeated measures and the *post hoc* Bonferroni test. The significance level was set at  $\alpha < 0.05$ .

**Results:** There were no differences between the *inflamed+HVPC(-)* and *inflamed+HVPC placebo* groups for the pain and edema parameters ( $p > 0.05$ ). There was an albumin reduction in the groups that received intervention, but with no differences among them. Regarding histamine, there was only a 24h increase for the *normal+HVPC(-)* ( $p = 0.0001$ ) and *inflamed+HVPC placebo* ( $p = 0.01$ ) groups compared to the *normal control* group.

**Conclusions:** The results of the present study suggest that HVPC(-) in the parameters employed did not reduce pain or edema, and did not change serum albumin and histamine levels, which indicates the inability of this resource to treat acute joint inflammation.

**KEY WORDS:** electrical stimulation, sprain, inflammation, albumin, histamine.

## INTRODUÇÃO

Em presença de inflamação, a habilidade do indivíduo para voltar a sua atividade normal ou a prática esportiva é freqüentemente dependente da diminuição da dor e do edema<sup>1</sup>. Portanto, o controle e resolução do edema são essenciais para uma rápida recuperação da funcionalidade nas lesões musculoesqueléticas.

Uma das formas de tratamento utilizadas na Fisioterapia para controlar a dor e o edema é a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV). Esta é uma corrente caracterizada por pulsos monofásicos duplo pico com uma duração muito curta (5 - 100µs) e intervalos interpulsáteis maiores o que produz uma corrente total baixa (1,5mA), apesar de ter uma voltagem maior do que 150V. Alguns estudos têm sido desenvolvidos para determinar a eficácia da EEAV na diminuição da dor e do edema em animais<sup>3-11</sup> e em humanos<sup>1</sup>. Os trabalhos com animais têm reportado diminuição do edema pós-trauma agudo quando utilizada a corrente monofásica<sup>3</sup>, com polaridade negativa (-) e nível de estimulação submotor<sup>4-8</sup>. Outros estudos que utilizaram polaridade positiva<sup>10</sup>, nível de estimulação motor<sup>11</sup> e corrente de baixa voltagem<sup>9</sup> não mostraram redução no edema. Na literatura revisada foi encontrado apenas um estudo em humanos mostrando somente diferenças clínicas na redução do edema crônico pós-traumático de mão<sup>1</sup>.

Os mecanismos pelos quais a EEAV(-) possivelmente atua na diminuição do edema têm sido pouco estudados e baseiam-se em várias hipóteses. Uma das primeiras foi o fenômeno eletrofisiológico descrito por Alon e De Domenico<sup>12</sup>, segundo o qual o transporte da EEAV(-) pelos tecidos, vai repelir as proteínas produzindo seu deslocamento no interstício da área traumatizada. Este aumento na mobilidade acelera a drenagem das proteínas pelos capilares linfáticos, facilitando o fluxo linfático e diminuindo a pressão oncótica intersticial e o edema. Esta hipótese foi parcialmente comprovada no estudo de Reed<sup>13</sup>, que reportou que intensidades de 30 e 50V de EEAV(-) diminuíram significativamente a permeabilidade às macromoléculas, limitando a formação do edema, principalmente na etapa aguda.

Outro possível mecanismo pelo qual tem sido sugerido que a EEAV(-) contribui para a diminuição do edema é o estímulo do fluxo linfático, facilitando sua drenagem<sup>5,14</sup>. Baseados na hipótese de Alon e De Domenico<sup>12</sup>, Cook<sup>15</sup> sugere que a EEAV(-) facilita o transporte da albumina aumentando seu movimento, o qual promove a abertura do lúmen linfático e a contração do músculo liso permitindo um maior movimento da albumina. Karnes<sup>9</sup> propõe duas outras hipóteses: primeira é que a EEAV(-) produz contração do músculo liso ao redor dos vasos sanguíneos, diminuindo o diâmetro das arteríolas; Na segunda hipótese a EEAV(-)

por ser polarizada gera acúmulo de cargas elétricas mudando assim o pH e diminuindo o edema.

Também Taylor et al.<sup>3</sup> observaram que a EEAV catódica reduziu o diâmetro das arteríolas, diminuindo o fluxo sanguíneo, sendo um outro possível mecanismo de ação. Deste modo, a EEVA(-) poderia influenciar a magnitude de liberação da histamina das células ou poderia afetar os sítios de ligação da histamina aos seus receptores nas vênulas pós-capilares das células endoteliais. Nestas hipóteses observa-se a importância da albumina e da histamina no efeito da EEAV(-). A albumina constitui 50% da proteína do plasma e é responsável por 75% de sua pressão coloidosmótica<sup>16</sup>. A histamina é uma amina dibásica vaso ativa secretada no início da inflamação e que produz dilatação das arteríolas, aumentando a permeabilidade vascular das grandes vênulas, permitindo a saída de líquido e proteínas para o espaço extra vascular<sup>17</sup>. Portanto, a albumina e a histamina são importantes marcadores da inflamação.

Considerando estes aspectos, a hipótese deste estudo é que a EEAV(-) diminui a formação do edema por meio de dois possíveis mecanismos: diminuindo a produção da histamina e reduzindo a saída da albumina ao espaço intersticial, decorrente de uma menor permeabilidade endotelial. O objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito da EEAV com polaridade negativa aplicada no tornozelo de ratos com inflamação articular aguda na dor, no edema e nos níveis séricos de albumina e histamina.

## METODOLOGIA

### Animais

Foram usados 64 ratos machos Wistar ( $311.5 \pm 36.1$ g). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas em grupos de quatro, com livre acesso a água e alimentação peletizada. Uma vez finalizado o protocolo experimental (48 horas) todos os animais foram eutanaziados com overdose de anestésico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade (No. 027/2007). **Grupos experimentais**

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (16 animais por grupo).

- **Grupo inflamado + EEAV(-):** foram submetidos a uma injeção de  $\iota$ -carragenina no tornozelo da pata direita e receberam imediatamente aplicação da estimulação de corrente elétrica de alta voltagem (EEAV) com polaridade negativa.
- **Grupo inflamado + EEAV placebo:** receberam a injeção de  $\iota$ -carragenina e a fixação dos eletrodos da EEVA, mas sem aplicação de corrente.
- **Grupo normal + EEAV(-):** submetido à aplicação de EEAV polaridade negativa com os mesmos parâmetros do grupo de intervenção.
- **Grupo controle normal (GCN):** não recebeu nenhuma intervenção.

Todos os animais foram pesados antes e ao final do experimento. Foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução composta de xilazina (12 mg/Kg) e ketamina (95 mg/Kg), para a indução do processo inflamatório, aplicação do protocolo de tratamento e para eutanásia. A região dorsal do tronco e ambas as patas traseiras foram tricotomizadas, para visualização dos locais de aplicação da injeção de carragenina e da fixação dos eletrodos.

### Procedimento de inflamação articular

A inflamação na articulação tibio-társica direita foi induzida por uma injeção de 0,03ml de  $\iota$ -carragenina a 3%, (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) dissolvida em solução salina (0,9% NaCl). Para a aplicação foi seguida a metodologia descrita por Omote et al<sup>18</sup>. A pata foi mantida em posição neutra e a injeção foi realizada na fossa distal e medial ao maléolo lateral, onde foi introduzida uma agulha de diâmetro 26, a qual dirigiu-se distalmente até atingir a cápsula articular. Após entrar no espaço articular, evidenciado pela perda de resistência, a  $\iota$ -carragenina foi injetada<sup>18</sup>.

### Variáveis avaliadas

Foram definidas como variáveis dependentes a dor, o volume e os níveis de albumina e histamina sanguíneos e como variável independente o peso corporal do animal.

- **Avaliação do volume:** foi mensurado através do método da volumetria, considerada prova de ouro e que tem mostrado uma alta reprodutibilidade (CCI=0,99) com um erro menor de 1%<sup>19</sup>. Este método baseia-se no princípio de Arquímedes e foi utilizado um copo de vidro especialmente construído para o tamanho da pata do animal (5cm de altura e 4cm de diâmetro). O recipiente foi previamente avaliado garantindo reprodutibilidade nas medidas de volume (CCI=0,95). Para padronizar a medida, foi feita uma marca na região lateral do tornozelo dos ratos, mensurando 1cm a partir da base do calcanhar. Em seguida, o animal foi suspenso por um suporte, similar ao utilizado por Dolan et al. em seus estudos<sup>6,7</sup>. Foi colocada água no copo até o nível máximo e esperou-se até que o vazamento de líquido se estabilizasse. Em seguida, foi introduzida a pata do animal até a marca do tornozelo. O líquido deslocado foi recolhido e mensurado fazendo uma equivalência de 1ml = 1mg. Esta medida foi realizada antes da aplicação da carragenina assim como 5, 24 e 48 horas após a indução da inflamação.

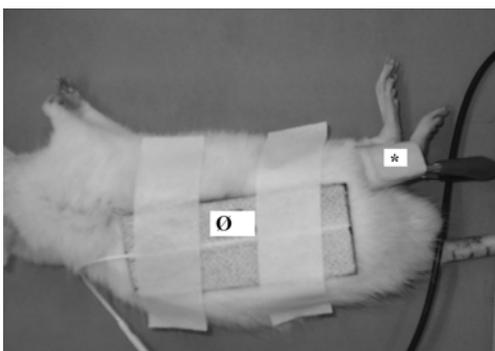
- **Avaliação da dor:** A dor foi avaliada utilizando o método da latência de retirada da pata ao calor radiante<sup>20-23</sup>, sendo considerado um método de alta reprodutibilidade ( $r^2=0,78$ )<sup>23</sup>. O animal foi colocado em uma caixa de vidro (20cm comprimento, 15cm largura e 15cm altura), a qual foi mantida sobre uma plataforma elevada com uma lâmpada embaixo da pata direita. Após 10 min de familiarização do animal com a área, a lâmpada e o cronômetro foram ligados simultaneamente. A partir deste momento foi registrado o tempo em segundos que o animal levava para retirar a pata do fundo da caixa, sendo denominado este período como tempo de latência de retirada da pata (LRP)<sup>20</sup>. Esta avaliação foi repetida 3 vezes mantendo um período de 5 minutos de repouso entre as mensurações e calculada a mediana dos valores de LRP das 3 avaliações. A LRP foi feita 12 horas antes de iniciar o experimento e 6, 24 e 48 horas depois da indução da inflamação. A avaliação da dor foi realizada uma hora após da mensuração do volume da pata, pois era necessário que o animal estivesse acordado para o teste.

- **Níveis séricos de albumina e histamina:** foram colhidos 2ml de sangue dos animais dos grupos eletroestimulados e placebo em dois períodos: 24 e 48 horas após a injeção de carragenina. No grupo *controle normal* foi feita somente uma coleta. A primeira coleta foi realizada no rabo do rato (*tail vein*) e a segunda na artéria renal. Estas coletas foram feitas em 8 dos 16 animais de cada grupo. A albumina foi processada utilizando o método do verde de bromocresol<sup>24</sup> e quantificada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 630nm. O radioimunoensaio foi a técnica utilizada para o processamento da histamina<sup>24</sup>.

### **Protocolo da EEAV**

Foi utilizado um equipamento para aplicação da EEAV (Ibramed modelo Neurodyn – High Volt, Brasil), com uma corrente caracterizada por pulsos monofásicos duplo pico. O

protocolo elétrico utilizado foi o seguinte: duração de pulso 20 $\mu$ s, intervalo interpulsátil de 100 $\mu$ s, frequência de 100pps e amplitude em um nível submotor. A amplitude foi aumentada gradualmente até observar uma contração muscular visível e em seguida foi diminuída até um limiar imediatamente abaixo da contração muscular. Foi utilizada polaridade negativa com dois eletrodos ativos auto adesivos quadrados (1cm<sup>2</sup>), fixados com fita adesiva nas regiões lateral e medial da articulação tibiotársica (figura 1). Um eletrodo dispersivo também auto adesivo retangular (9x3cm) foi mantido na região dorsal do tronco do animal. Durante a aplicação da corrente os animais foram mantidos deitados em ambiente aquecido para evitar a hipotermia gerada pela anestesia. Os animais dos grupos *inflamado+ EEAV(-)* e *inflamado + EEAV placebo* começaram imediatamente com o tratamento da EEAV após a injeção da carragenina e os do grupo normal + EEAV(-) após a tricotomia. Todos os animais destes três grupos receberam uma sessão diária de eletroestimulação ou placebo durante 45 minutos por 3 dias consecutivos.



**Figura 1.** Colocação dos eletrodos. Os eletrodos ativos (\*) aplicados sobre as faces medial e lateral do tornozelo e o dispersivo (Ø) na região dorsal do tronco do rato.

## ANALISE ESTATISTICA

Foi aplicado o teste t de *student* pareado para determinar possíveis diferenças (inicial e final) no peso, histamina e albumina nos animais; além disso, foi determinada também a porcentagem de variação do peso  $[(\text{peso final} \times 100)/\text{peso inicial}]$ . A descrição e a comparação das variáveis por grupo de intervenção foram feitas aplicando uma análise de variância (ANOVA) *one way*. No caso de apresentar diferenças foi aplicado o teste de Bonferroni. Na variável dor foram estabelecidas as diferenças entre os grupos aplicando o teste de Kruskal-Wallis. Os valores referentes ao volume e a dor foram analisados em diferentes períodos com ANOVA de mensurações repetidas tipo *nested*. Os dados foram processados no software STATA 9,0 e foi determinado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Peso corporal

Houve diferença entre o peso inicial e final em todos os grupos, com perda de peso nos três grupos que receberam intervenção, sendo esta maior no grupo *inflamado+EEAV(-)* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comparação das médias dos pesos inicial e final(g) nos 4 grupos de estudo

	<b>Controle Normal</b>	<b>Normal + EEAV(-)</b>	<b>Inflamado + EEAV placebo</b>	<b>Inflamado + EEAV(-)</b>
<b>Peso inicial (g)</b>	283,4±34,2	327,1±35,3	324,6±32,9	310,9±26,4
<b>Peso final (g)</b>	291,9±35,6	316,1±31,7	308,2±30,8	289,6±23*
<b>p (inicial e final)</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>% de variação</b>	+3%	3,38%	5,05%	6,9%

\* p<0,05 comparado ao *normal+EEAV(-)*  
% variação: [(peso final x 100)/peso inicial]

### Dor

A comparação entre os grupos dos valores da LRP nos diferentes períodos avaliados não mostrou diferenças estatísticas entre eles (Tabela 2). O mesmo aconteceu na LRP mensurada ao início e no final do experimento nos grupos intervindos (Tabela 2). Também não foram identificadas diferenças por tratamento e por período de avaliação (p=0,09 e p=0,33, respectivamente. ANOVA de mensurações repetidas *nested*).

**Tabela 2.** Medianas da LRP (tempo de latência de retirada da pata) (s) nos grupos ao longo das 48h.

<b>Tempo</b>	<b>Controle Normal</b>	<b>Normal + EEAV(-)</b>	<b>Inflamado + EEAV placebo</b>	<b>Inflamado + EEAV(-)</b>	<b>p (entre grupos)</b>
0 (s)	26,5 [19-40]	37,5 [18-64]	25,5 [16-34]	31,5 [24,5-51]	0,25
6 (s)			24,5 [17,5-49,5]	29 [17-58]	0,83
24 (s)			28,5 [18-49]	32,5 [20,5-50,5]	0,45
48 (s)		31 [21-51]	24,5 [15,5-32]	32,5 [21,5-58,5]	0,36
p (0 Vs. 48h)		0,80	0,89	0,85	

Dados apresentados como mediana [RIC].

### Volume

Todos os grupos apresentaram volume similar da pata na avaliação inicial pré indução da inflamação (p=0,65). O pico do processo inflamatório foi observado 24h após a indução da

inflamação (Tabela 3). Houve aumento significativo no volume 24h, comparado ao período pré-inflamatório nos grupos *inflamado+EEAV(-)* e *inflamado+EEAV placebo*, (Tabela 3), sendo mantida esta diferença na avaliação 48h. No entanto, não houve diferença entre estes dois grupos em nenhum dos tempos avaliados. Não foram identificadas diferenças por tratamento ( $p=0,22$ ) ou por período de avaliação ( $p=0,057$ ) (ANOVA de mensurações repetidas *nested*).

**Tabela 3.** Comparação do volume (média  $\pm$  desvio padrão) (ml) dos 4 grupos de estudo

Tempo	Controle Normal	Normal + EEAV(-)	Inflamado + EEAV Placebo	Inflamado+ EEAV(-)	p (entre grupos)
0	2,07 $\pm$ 0,28	2,16 $\pm$ 0,47	2,03 $\pm$ 0,34	2,16 $\pm$ 0,29	0,65
5			2,09 $\pm$ 0,24	2,24 $\pm$ 0,26	0,12
24			2,59 $\pm$ 0,37*	2,88 $\pm$ 0,43*	0,06
48			2,54 $\pm$ 0,24*	2,63 $\pm$ 0,43*	0,49
p (0 Vs. 24 e 48h)			<0,0001	<0,0001	

$p<0,0001$  quando comparados aos seus respectivos valores no período pré-inflamação (tempo 0).

### Albumina

Não houve diferença na albumina sérica 24h entre os 4 grupos avaliados ( $p=0,34$ ). Esses níveis diminuíram quando comparados ao período 48h nos grupos *normal+EEAV(-)*, *inflamado+ EEAV placebo* e *inflamado+EEAV(-)*, sem diferença entre os grupos ( $p=0,89$ ; Tabela 4).

**Tabela 4.** Comparação da albumina (média  $\pm$  desvio padrão) (g/dL) 24 e 48 horas nos 4 grupos de estudo

Tempo	Controle Normal	Normal + EEAV(-)	Inflamado + EEAV Placebo	Inflamado + EEAV(-)
24h	2,52 $\pm$ 0,54	2,76 $\pm$ 0,24	2,83 $\pm$ 0,37	2,8 $\pm$ 0,3
48h		2,46 $\pm$ 0,29*	2,34 $\pm$ 0,2*	2,3 $\pm$ 0,33*
p (24 Vs. 48h)		0,03	<0,0001	0,004

$p<0,05$  quando comparados aos seus respectivos valores no período 24 horas(tempo 24h).

### Histamina

Houve diferenças entre os 4 grupos nos níveis séricos de histamina no período 24h ( $p=0,006$ ; Tabela 5). No entanto, somente os grupos *normal+EEAV(-)* e *inflamado+EEAV placebo* apresentaram aumento significativo dos níveis de histamina, em relação ao grupo *controle normal* ( $p=0,001$  e  $p=0,01$ , respectivamente). Na avaliação 48h, nota-se um declínio nos níveis de histamina nos três grupos que receberam intervenção (Tabela 5). No entanto,

essa diferença só foi significativa para o grupo *normal +EEAV(-)* ( $p < 0,0001$ ), quando comparada aos valores das 24h (Tabela 5). Não houve diferença nos níveis da histamina entre os três grupos experimentais 48h após a indução da inflamação ( $p = 0,20$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comparação da histamina (média  $\pm$ desvio padrão) (nmol/l) 24 e 48 horas nos grupos de tratamento.

<b>Tempo</b>	<b>Controle Normal</b>	<b>Normal + EEVA(-)</b>	<b>Inflamado +EEAV Placebo</b>	<b>Inflamado +EEAV(-)</b>
<b>24h</b>	3,09 $\pm$ 3,31	9,25 $\pm$ 3,01*	8,34 $\pm$ 3,9*	5,68 $\pm$ 2,68
<b>48h</b>		6,64 $\pm$ 2,76†	5,16 $\pm$ 2,62	3,9 $\pm$ 1,15
<b>p(24 Vs. 48h)</b>		<0,0001	0,18	0,30

\*  $p < 0,05$  comparado ao *controle normal*

†  $p < 0,05$  quando comparado ao seu respectivo valor no período 24 horas (tempo 24h)

## DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a EEVA(-) aplicada no nível submotor, 30 minutos por dia, durante 3 dias consecutivos não foi efetiva para diminuir a dor e o edema na inflamação articular aguda induzida por *ι*-carragenina. Estes resultados são interessantes porque vários dos parâmetros utilizados são similares aos aplicados em estudos prévios<sup>1,4-8,10,11,13-15</sup>, permitindo algumas comparações.

Neste estudo a *ι*-carragenina foi utilizada para gerar inflamação, sendo um modelo de nocicepção aguda, sensibilizando os aferentes primários e gerando hiperalgisia primária no lugar da lesão<sup>25</sup>. A seguir ocorre uma elevada produção de óxido nítrico, prostaglandinas, radicais livres e ciclo-oxigenases que ativam os neurônios do corno dorsal gerando sensibilização central espinal ou supra espinal, a qual junto com o aumento da sensibilidade dos nociceptores periféricos manifestam-se como uma hiperalgisia secundária<sup>25</sup>. Utilizando esse mesmo modelo experimental Sluka et al.<sup>21</sup> mostraram diminuição da hiperalgisia primária com a aplicação de TENS de alta frequência (100Hz), similar à utilizada no presente estudo. Em nossos resultados não houve diferença nos grupos inflamados tratados com EEAV ou submetidos ao tratamento placebo. Uma possível causa poderia ser a curta duração do pulso da EEAV utilizado, que não permitiu a estimulação dos receptores A $\delta$  ou inibição dos neurônios do corno dorsal.

O processo inflamatório produzido pela carragenina no presente estudo foi similar a trabalhos anteriores<sup>20,22,23,25</sup> que relatam presença de dor e edema nas 5h com persistência até 24h e diminuição após esse período, semelhante ao observado no presente estudo. A EEAV(-) não causou maior diminuição do edema no grupo *inflamado+EEAV(-)* comparado com o grupo inflamado e tratado com placebo. Nesse sentido, nossos resultados não coincidem com os obtidos em estudos prévios, onde foram identificadas diferenças significativas na redução do edema da pata dos ratos induzida por trauma<sup>3-8,13</sup>. Talvez o mecanismo de indução da inflamação (carragenina e trauma) tenha alguma influência nesses resultados distintos.

Os parâmetros da EEAV que utilizam são os mesmos usados em protocolos de estudos anteriores em relação ao tipo de corrente<sup>1,4-8,10,11,13-15</sup>, o nível de estimulação<sup>4-8,15</sup>, a polaridade<sup>1,4-8,10,11,13-15</sup> e a frequência, bem como a aplicação imediata da estimulação depois da indução da inflamação. As diferenças em nosso protocolo foram o mecanismo de lesão e o tempo de aplicação da corrente.

Os trabalhos prévios<sup>3-8,13</sup> usaram um trauma para gerar a inflamação, enquanto que nós optamos pela carragenina, substância indutora de inflamação aguda, mas que produz na fase aguda presença principalmente de células polimorfonucleares no líquido sinovial, acompanhado por proliferação e infiltração da membrana sinovial com diminuição gradual do número de células no líquido sinovial após 24 horas da indução da inflamação<sup>26</sup>. Este modelo foi escolhido para o presente estudo por produzir um padrão homogêneo no acometimento dos tecidos moles e articulares. Esse padrão homogêneo de inflamação entre as unidades experimentais não pode ser garantido no modelo de trauma mecânico. Nossos resultados indicam que a EEAV(-), com os parâmetros utilizados não foi efetiva para controlar o processo inflamatório induzido pela carragenina, possivelmente pelo acometimento da cartilagem. No entanto, estudos futuros que avaliem a cartilagem articular e a presença de citocinas inflamatórias circulantes como IL-6 e TNF- $\alpha$  deveriam ser realizados.

Em relação ao tempo de aplicação da corrente, foram usados 45 minutos diários por três dias consecutivos, tentando mimetizar o que é feito na prática clínica. Nos estudos anteriores<sup>4,6-8</sup> foi reportada diminuição do edema aplicando três ou quatro intervenções de 30 minutos no mesmo dia da lesão (total 1,5h a 2h por dia), com repouso de 30 minutos entre as séries, observando incremento do edema nos períodos de não intervenção. Comparado ao nosso estudo, esses resultados indicam que o tempo de aplicação pode ser crítico na diminuição do edema, conforme o proposto por Mendel e Fish<sup>27</sup> que sugeriram utilizar tempos de aplicação maiores durante a etapa aguda da inflamação. Em estudos futuros seria também interessante ampliar o tempo da aplicação da EEVA(-) em modelos de inflamação aguda.

Em relação aos níveis séricos da albumina houve redução nos grupos submetidos à inflamação nas 48 horas. A fase aguda inflamatória gerada pela carragenina é caracterizada pelo aumento das citocinas circulantes como IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ , as quais produzem dois efeitos<sup>29</sup>. O primeiro é o aumento da permeabilidade microvascular permitindo uma grande perda de proteínas do plasma e aumento no espaço intersticial. O segundo é a diminuição da síntese e liberação de proteínas negativas de fase aguda como a ferritina e a albumina<sup>28</sup>. Esses fatores geram hipoalbuminemia, a qual foi observada nas 48 horas, principalmente nos animais deste estudo submetidos à inflamação. Por outro lado, uma resposta em menor intensidade foi encontrada nos animais do grupo *normal +EEAV (-)*, explicada possivelmente pela diminuição do volume de plasma e pela anestesia, coincidindo com o estudo de Renkin et al<sup>29</sup>. Um outro fator que pode ter influenciado a diminuição da albumina é a diminuição de peso dos animais. Em nosso estudo não houve diferença nos valores da albumina entre os dois

grupos submetidos à inflamação, sendo coerente com os resultados prévios do volume da pata e indicando ausência do efeito da EEAV(-) sobre a permeabilidade do endotélio, rejeitando assim a nossa segunda hipótese. Uma possível explicação é que a curta duração do pulso não consegue gerar movimentação nas proteínas plasmáticas conforme o sugerido por Mendel e Fish<sup>27</sup>.

A histamina no sangue foi selecionada por sua importância como mediador durante a inflamação aguda. Além disso, tem sido mostrado que a carragenina aplicada localmente produz uma reação sistêmica em resposta à inflamação local, consistente com uma resposta de fase aguda<sup>30</sup>. Houve diferença nos níveis séricos de histamina entre os grupos *inflamado+EEAV placebo* e *normal+EEAV (-)* quando comparado ao grupo *controle normal*, após 24 horas do início do experimento. Vale salientar que o aumento foi maior no grupo normal submetido à EEVA(-). Dois estudos prévios<sup>31,32</sup> tinham reportado aumento do precursor da histamina (histidine-decarboxilase) no músculo esquelético, após a aplicação de estimulação elétrica direta com pico 8-12h pós estimulação. O aumento desse precursor foi dependente da intensidade e duração da estimulação<sup>31</sup> indicando que a estimulação elétrica poderia gerar um aumento nos níveis de mediadores como a histamina. Essa ação pode estar relacionada ao estresse local produzido pela corrente e às alterações metabólicas ocorridas no local da aplicação. Estudos subseqüentes são necessários para comprovar essas hipóteses.

Por outro lado o grupo *inflamado+EEAV(-)* não apresentou diferença na histamina em relação aos outros grupos em 24 e 48h. Tal resultado indica que, possivelmente, durante a fase aguda do processo inflamatório, a EEAV(-) não é capaz de controlar a regulação da liberação da histamina ou afetar seus sítios de ligação nas vênulas pós-capilares das células endoteliais, contrariando a hipótese proposta por Taylor et al.<sup>3</sup>. Por esta razão, em futuros estudos poderiam ser estudados marcadores mais sensíveis da inflamação como o TNF $\alpha$  ou a IL-1.

### **Implicações clínicas**

Embora a EEAV(-) não tenha mostrado efetividade no tratamento da inflamação articular aguda, ela influenciou a liberação de mediadores como a histamina em animais normais. No entanto, é necessário analisar as implicações fisiológicas desse resultado, bem como avaliar se ele também ocorre em humanos.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados desse estudo indicam que a EEAV(-) com os parâmetros utilizados, aplicada na fase aguda da inflamação articular induzida por carragenina, não foi efetiva para reduzir ou amenizar os sinais da inflamação.

## REFERÊNCIAS

- 1- Griffin JW, Newsome LS, Stralka SW, Wright PE: Reduction of chronic posttraumatic hand edema: A comparison of high voltage pulsed current, intermittent pneumatic compression, and placebo treatments. *Phys Ther* 1990;70:279-286.
- 2- Nelson RM, Hayes KW, Currier DP: *Clinical Electrotherapy*. USA: Appleton & Lange; 1999:55-139.
- 3- Taylor K, Mendel FC, Fish DR, Hard R, Burton HW: Effect of high-voltage pulsed current and alternating current on macromolecular leakage in hamster cheek pouch microcirculation. *Phys Ther* 1997;77:1729-1740.
- 4- Bettany JA, Fish DR, Mendel FC: Influence of high voltage pulsed direct current on edema formation following impact injury. *Phys Ther* 1990;70:219-224.
- 5- Taylor K, Fish DR, Mendel FC, Burton HW: Effect of a single 30-minute treatment of high voltage pulsed current on edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther* 1992;72:63-68.
- 6- Dolan MG, Graves P, Nakazawa C, Delano T, et al: Effects of ibuprofen and high-voltage electric stimulation on acute edema formation after blunt trauma to limbs of rats. *J Athl Train* 2005;40:111-115.
- 7- Dolan MG, Mychaskiw AM, Mendel FC: Cool-water immersion and high-voltage electric stimulation curb edema formation in rats. *J Athl Train* 2003;38:225 -230.
- 8- Thornton RM, Mendel FC, Fish DR: Effects of electrical stimulation on edema formation in different strains of rats. *Phys Ther* 1998;78:386-394.
- 9- Karnes JL, Mendel FC, Fish DR: Effects of low voltage pulsed current on edema formation in frog hind limbs following impact injury. *Phys Ther* 1992;72:273-278.
- 10- Fish DR, Mendel FC, Schultz AM, Gottstein-Yerke LM: Effect of anodal high voltage pulsed current on edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther* 1991;71:724-733.
- 11- Taylor K, Fish DR, Mendel FC, Burton HW: Effect of electrically induced muscle contractions on posttraumatic edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther* 1992;72:127-132.
- 12- Cosgrove KA, Alon G, Bell SF, Fisher SR, et al.: The electrical effect of two commonly used clinical stimulators on traumatic edema in rats. *Phys Ther* 1992;72:227- 233.
- 13- Reed BV: Effect of high voltage pulsed electrical stimulation on microvascular permeability to plasma proteins. A possible mechanism in minimizing edema. *Phys Ther* 1988;68:491-495.
- 14- Mohr TM, Akers TK, Landry RG: Effect of high voltage stimulation on edema reduction in the rat hind limb. *Phys Ther* 1987;67: 1703-1707.

- 15- Cook HA, Morales M, La Rosa EM, et al: Effects of electrical stimulation on lymphatic flow and limb volume in the rat. *Phys Ther* 1994;74,11:1040 – 1046.
- 16- Evans TW: Review article: albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (Suppl. 5): 6–11.
- 17- Michel CC, Kendall S: Differing effects of histamine and serotonin on microvascular permeability in anaesthetized rats. *J Physiol* 1997;501;657-662.
- 18- Omote K, Kawamata T, Naka Yama Y, et al: Effects of a novel selective agonist for prostaglandin receptor subtype EP4 on hyperalgesia and inflammation in monoarthritic model. *Anesthesiology* 2002;97;170–176.
- 19- Karges JR, Mark BE, Stikeleather SJ, Worrell TW: Concurrent validity of upper-extremity volume estimates: Comparison of calculated volume derived from girth measurements and water displacement volume. *Phys Ther* 2003;83:134 –145.
- 20- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al.: A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-88.
- 21- Sluka KA, Bailey K, Bogush J, Olson R, Ricketts A: Treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint. *Pain* 1998; 77:97–102.
- 22- Gopalkrishnan P, Sluka KA. Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2000; 81:984-990.
- 23- Sluka KA, Christy MR, Peterson WL, Rudd SL, Troy SM. Reduction of pain-related with either cold or heat treatment in an animal model of acute arthritis. *Arch Phys Med Rehabil* 1999;80:313-317.
- 24- Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmierczak SC. *Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation.* 4 ed. St Louis. Mosby. 2003.
- 25- Salvemini D, Wang Z, Wyatt PS, Bourdon DM. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan – induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 829 – 838.
- 26- Santer V, Sriratana A, Lowther DA: Carrageenan-induced arthritis: V. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1983;13:160-168.
- 27- Mendel FC, Fish DR: New perspectives in edema control via electrical stimulation. *J Athl Train* 1993;28:63-74.
- 28- Yeun YJ, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA: C-Reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000;35:469-476.

- 29- Renkin EM, Joyner WL, Gustafson-Sgro M, et al: Albumin extravasation rates in tissues of anesthetized and unanesthetized rats. *J Appl Physiol* 1989;66:2056-2060.
- 30- Cicala C, Morello S, Alfieri A, et al: Haemostatic imbalance following carragenina-induced rat paw oedema. *Eur J Pharmacol* 2007;577:156–161.
- 31- Endo Y, Tabata T, Kuroda H, et al: Induction of histidine decarboxylase in skeletal muscle in mice by electrical stimulation, prolonged walking and interleukin-1. *J Physiol* 1998;509:587-598.
- 32- Watanabe M, Tabata T, Huh JI, et al: Possible involvement of histamine in muscular fatigue in temporomandibular disorders: animal and human studies. *J Dent Res* 1999;78:769-775.

## 5. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

### **A ESTIMULAÇÃO ELETRICA DE ALTA VOLTAGEM NÃO EVITA AS LESÕES DA CARTILAGEM NOS PROCESSOS INFLAMATORIOS ARTICULARES AGUDOS**

MS. SANDOVAL MARIA CRISTINA<sup>1</sup>, MS. RAMIREZ CAROLINA<sup>2</sup>, Ph.D.

MATTIELLO-ROSA STELLA<sup>3</sup>, Ph.D. SALVINI TANIA DE FATIMA<sup>4</sup>.

1. Professora Associada, Escuela de Fisioterapia, Universidad Industrial de Santander - Bucaramanga (Santander), Colômbia.
2. MS. em Fisioterapia, Laboratório de Neurociências, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos (SP), Brasil.
3. Professora Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos (SP), Brasil.
4. Professora Titular, Unidade de Plasticidade Muscular, Laboratório de Neurociências, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos (SP), Brasil.

Correspondência para:

Maria Cristina Sandoval

Carrera 32 No. 29-31

Facultad de Salud – Escuela de Fisioterapia -Universidad Industrial de Santander

Bucaramanga (Santander), Colômbia.

E-mail: [sandoval@uis.edu.co](mailto:sandoval@uis.edu.co)

## RESUMO

**Objetivo:** avaliar o efeito da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) com polaridade negativa (-) aplicada no tornozelo de ratos com inflamação articular aguda na dor, volume e morfometria da cartilagem.

**Metodologia:** sessenta e quatro ratos Wistar foram divididos em quatro grupos similares (n=16): *inflamado+EEAV(-)*, aplicação de 0,03ml de *t*-carragenina (3%) na articulação tibio-társica e EEAV(-); *inflamado+EEAV placebo*, aplicação de carragenina e EEAV placebo; *normal +EEAV(-)*, aplicação de EEAV(-); *controle normal*, sem intervenção. EEAV(-) 100Hz em um nível submotor foi aplicada 45min por sessão durante 3 dias. As variáveis foram dor e volume avaliados antes e durante as 48 horas pós inflamação, bem como avaliação qualitativa e mensuração do número de células, espessura e densidade óptica da cartilagem. As variáveis foram comparadas pelo teste t de *student*, ANOVA *one way*, ANOVA de medidas repetidas nested e teste de Bonferroni *post hoc*. Foi definido um nível  $\alpha < 0,05$ .

**Resultados:** Não houve diferença entre os grupos *inflamado+EEAV(-)* e *inflamado+EEAV placebo* nos parâmetros de dor e volume ( $p > 0,05$ ). Na avaliação da cartilagem houve maior presença de pannus, menor quantidade de células e diminuição da ortocromasia para a Safranina-O no grupo *inflamado+EEAV(-)* ( $p < 0,05$ ). No grupo *inflamado+EEAV placebo* houve menor densidade óptica da cartilagem e uma menor ortocromasia para a safranina-0 ( $p < 0,05$ ).

**Conclusão:** A EEVA(-) com os parâmetros usados e aplicada no tornozelo de ratos com inflamação articular aguda gerada por carragenina não conseguiu diminuir o edema e a dor bem como evitar as alterações na cartilagem.

## INTRODUÇÃO

Os processos inflamatórios articulares têm-se incrementado na última década, sendo uma das principais causas de incapacidade e que em poucos anos se constituíram em problemas de saúde pública. Isto tem sido reconhecido pela Organização das Nações Unidas e pela Organização Mundial da Saúde através da declaração do período 2000-2010 como a década do osso e das articulações. Estimativas mundiais indicam que 9.6% dos homens e 18% das mulheres maiores de 60 anos apresentam osteoartrite e há uma prevalência entre 0.3% e 1% de artrite reumatóide nos países desenvolvidos<sup>1</sup>.

Há diversas opções de tratamento destas doenças tais como exercício, medicamentos e cirurgias dentre outros, porém os efeitos adversos e as complicações restringem sua utilização. Em Fisioterapia têm sido utilizadas diversas modalidades físicas para o tratamento dos processos inflamatórios articulares como parte do processo de reabilitação, sendo a estimulação elétrica uma delas. O objetivo terapêutico geral desses agentes é diminuir a dor e inflamação.

A estimulação elétrica tem como vantagens ser não invasiva, de fácil aplicação e não produzir efeitos secundários significativos<sup>2</sup>. Um dos tipos de corrente mais utilizada é a estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS). Em uma revisão sistemática essa forma de intervenção mostrou um efeito significativo, principalmente na diminuição da dor em osteoartrite de joelho, quando aplicada por períodos maiores que 6 semanas<sup>3</sup>. O painel de Ottawa recomendou a inclusão deste agente no tratamento da artrite reumatóide por contar com bons níveis de evidência<sup>2</sup>. Adicionalmente, em uma revisão de *Cochrane* concluiu-se que o TENS convencional aplicado em artrite reumatóide não mostrou benefício clínico na dor comparado com o placebo, enquanto que o TENS aplicado nos pontos de acupuntura produz diminuição significativa da dor<sup>4</sup>.

Nos processos inflamatórios articulares também tem sido utilizada a corrente direta, mas com o objetivo de promover a cicatrização do tecido conjuntivo e especificamente da cartilagem. Estudos prévios em cultura celular e em modelos animais têm mostrado efeitos dos campos elétricos no processo de reparo nos defeitos da cartilagem articular<sup>5-11</sup>, utilizando a corrente direta.

Ainda não se conhecem os efeitos sobre a cartilagem das correntes geradas pelos TENS. Uma delas é a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) que se caracteriza por ter um pulso monofásico duplo pico, gerando uma voltagem maior do que 150V, apesar de ter

uma corrente total baixa (1,5mA), com uma duração muito curta (5 – 100 $\mu$ s) e intervalos interpulsos maiores<sup>12</sup>. Estas características permitem que a EEAV gere pouca ou nenhuma reação eletroquímica entre a pele e os eletrodos de estimulação, provocando uma sensação confortável.

Por estas razões o objetivo do estudo foi determinar o efeito da estimulação elétrica de alta voltagem na dor, volume e na morfometria da cartilagem do tornozelo de ratos com inflamação aguda induzida por carragenina.

## METODOLOGIA

### Animais

Foram usados 64 ratos machos Wistar ( $311.5 \pm 36.1$ g). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas em grupos de quatro, com livre acesso a água e alimentação peletizada. Uma vez finalizado o protocolo experimental (48 horas) todos os animais foram eutanaziados com overdose de anestésico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade (No. 027/2007).

### Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (16 animais por grupo).

- **Grupo inflamado + EEAV(-):** foram submetidos a uma injeção de *t*-carragenina no tornozelo da pata direita e receberam imediatamente aplicação da estimulação de corrente elétrica de alta voltagem (EEAV) com polaridade negativa.
- **Grupo inflamado + EEAV placebo:** receberam a injeção de *t*-carragenina e a fixação dos eletrodos da EEVA, mas sem aplicação de corrente.
- **Grupo normal + EEAV(-):** submetido à aplicação de EEAV polaridade negativa com os mesmos parâmetros do grupo de intervenção.
- **Grupo controle normal (GCN):** não recebeu nenhuma intervenção.

Todos os animais foram pesados antes e ao final do experimento. Foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução composta de xilazina (12 mg/Kg) e ketamina (95 mg/Kg), para a indução do processo inflamatório, aplicação do protocolo de tratamento e para eutanásia. A região dorsal do tronco e ambas as patas traseiras foram tricotomizadas, para visualização dos locais de aplicação da injeção de carragenina e da fixação dos eletrodos.

### Procedimento de inflamação articular

A inflamação na articulação tibio-társica direita foi induzida por uma injeção de 0,03ml de *t*-carragenina a 3%, (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) dissolvida em solução salina (0,9% NaCl). Para a aplicação foi seguida a metodologia descrita por Omote et al<sup>13</sup> e Wang et al.<sup>14</sup>. A pata foi mantida em posição neutra e a injeção foi realizada na fossa distal e medial ao maléolo lateral, onde foi introduzida uma agulha de diâmetro 26, a qual dirigiu-se distalmente até atingir a cápsula articular. Após entrar no espaço articular, evidenciado pela perda de resistência, a *t*-carragenina foi injetada<sup>19</sup>.

### **Variáveis avaliadas**

Foram definidas como variáveis dependentes a dor, o volume e a análise histológica e morfométrica da cartilagem.

- **Avaliação do volume:** foi mensurado através do método da volumetria, considerada padrão de ouro e que tem mostrado uma alta reprodutibilidade (CCI=0,99) com um erro menor de 1%<sup>15,16</sup>. Este método baseia-se no princípio de Arquimedes e foi utilizado um copo de vidro especialmente construído para o tamanho da pata do animal (5cm de altura e 4cm de diâmetro). O recipiente foi previamente avaliado garantindo reprodutibilidade nas medidas de volume (CCI=0,95). Para padronizar a medida, foi feita uma marca na região lateral do tornozelo dos ratos, mensurando 1cm a partir da base do calcânhar. Em seguida, o animal foi suspenso por um suporte, similar ao utilizado por Dolan et al. em seus estudos<sup>17,18</sup>. Foi colocada água no copo até o nível máximo e esperou-se até que o vazamento de líquido se estabiliza-se. Em seguida, foi introduzida a pata do animal até a marca do tornozelo. O líquido deslocado foi recolhido e mensurado fazendo uma equivalência de 1ml = 1mg. Esta medida foi realizada antes da aplicação da carragenina assim como 5, 24 e 48 horas após a indução da inflamação.

- **Avaliação da dor:** A dor foi avaliada utilizando o método da latência de retirada da pata ao calor radiante<sup>19-22</sup>, sendo considerado um método de alta reprodutibilidade ( $r^2=0,78$ )<sup>22</sup>. O animal foi colocado em uma caixa de vidro (20cm comprimento, 15cm largura e 15cm altura), a qual foi mantida sobre uma plataforma elevada com uma lâmpada embaixo da pata direita. Após 10 min de familiarização do animal com a área, a lâmpada e o cronômetro foram ligados simultaneamente. A partir deste momento foi registrado o tempo em segundos que o animal levava para retirar a pata do fundo da caixa, sendo denominado este período como tempo de latência de retirada da pata (LRP)<sup>19</sup>. Esta avaliação foi repetida 3 vezes mantendo um período de 5 minutos de repouso entre as mensurações e calculada a mediana dos valores de LRP das 3 avaliações. A LRP foi feita 12 horas antes de iniciar o experimento e 6, 24 e 48 horas depois da indução da inflamação. A avaliação da dor foi realizada uma hora após da do volume da pata, pois era necessário que o animal estivesse acordado para o teste.

**Análise morfométrica da cartilagem:** As patas direita e esquerda de todos os animais foram removidas e fixadas em formaldeído a 10%. O complexo do tornozelo foi descalcificado em ácido nítrico (7.5%) e glicerina (7.5%) por 4 dias (96h). Posteriormente a articulação tíbio-társica foi dividida no ponto médio entre os maléolos em duas partes (medial e lateral do tornozelo), as quais foram processadas em parafina e obtidos cortes de 5 µm de espessura em micrótomo.

De cada bloco foram montadas duas lâminas, obtendo um total de 4 por tornozelo. Posteriormente para a análise morfométrica as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e com coloração especial safranina – O *fast green*. Para a avaliação morfométrica foram selecionadas aleatoriamente duas lâminas correspondentes às regiões medial e lateral do tornozelo e foi feita uma avaliação quantitativa e uma qualitativa, as quais foram cegas.

A primeira incluiu a mensuração da espessura da cartilagem e da densidade óptica, bem como a contagem do número de células. Para determinar a espessura da cartilagem o avaliador identificou em cada lâmina corada com H&E um campo central e mensurou a espessura dessa área desde o osso subcondral até a superfície articular, utilizando o software Axiovision 4,7 Image Analysis (Carl Zeiss). A seguir foram traçadas duas linhas de 300 $\mu$ m à direita e à esquerda em relação à linha central, para fazer mais duas medidas e finalmente determinar uma média entre as três mensurações da espessura (figura 1). As células foram contadas utilizando o mesmo software e definindo uma área de 40.000 $\mu$ m<sup>2</sup> em uma região central de carga da cartilagem, incluindo a superfície articular e a camada calcificada (figura 1). As lâminas coradas com safranina-O foram analisadas com o software Image Pro-plus versão 6.0 (Media Cybernetics) para determinar a densidade óptica e também a ortocromasia com este corante. Este software produz esta medida através da quantificação dos *pixels* de coloração, sendo selecionada neste estudo a cor vermelha.

Para a análise qualitativa e histológica foi utilizada a escala modificada de Mankin<sup>23</sup> (Tabela 1) que tem como critérios de avaliação a celularidade, as alterações da superfície articular, a presença de pannus e a ortocromasia para a safranina-O. Esta escala define graus de lesão para cada um destes critérios sendo ausente, leve, moderado e severo. As lâminas foram analisadas em forma cega pelo mesmo avaliador, deixando uma semana entre as duas medidas. Após foi determinada a reprodutibilidade intra-avaliador utilizando um coeficiente de correlação intraclasse.

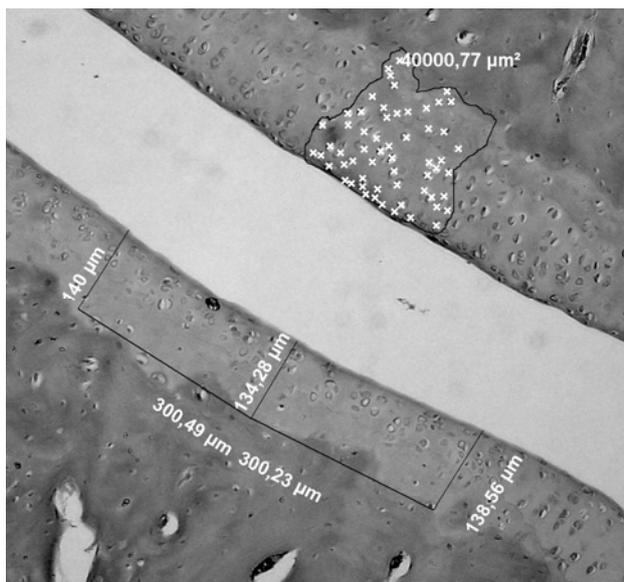


Figura 1. Ilustração das medidas da espessura (cartilagem inferior) e número de células (cartilagem superior). Para a mensuração da espessura foi feita uma medida central e a partir dessa linha foram mensurados 300 µm à esquerda e direita e feitas mais duas mensurações, obtendo a média entre as tres medidas. A contagem das células foi realizada em uma area de 40.000 µm<sup>2</sup>.

Tabela 1. Sistema de gradação histológica/histoquímica modificada de Mankin et al.<sup>23</sup>

<b>Crítérios de avaliação</b>	<b>Classificação dos níveis de lesão</b>
<b>I. Celularidade</b>	
Normal	<b>0</b>
Perdas de células na zona superficial	<b>1</b>
Perdas de células nas zonas superficial e média	<b>2</b>
Perdas de células nas zonas superficial, média e profunda.	<b>3</b>
<b>II. Alteração da superfície articular</b>	
Sem alterações	<b>0</b>
Fibrilação focal	<b>1</b>
Fibrilação moderada (em toda a superfície articular)	<b>2</b>
Erosão da superfície articular	<b>3</b>
<b>III. Presença de pannus articular</b>	
Ausência de pannus	<b>0</b>
Pannus cobrindo margens da superfície articular	<b>1</b>
Pannus cobrindo áreas focais da superfície articular	<b>2</b>
Pannus cobrindo toda a superfície articular	<b>3</b>
<b>IV. Ortocromasia com safranina-O</b>	
Normal (ausência de perdas pela coloração especial)	<b>0</b>
Perdas leves e focais	<b>1</b>
Perdas moderadas	<b>2</b>
Perdas graves	<b>3</b>

## Protocolo da EEAV

Foi utilizado um equipamento para aplicação da EEAV (Ibramed modelo Neurodyn – High Volt, Brasil), com uma corrente caracterizada por pulsos monofásicos duplo pico. O protocolo elétrico utilizado foi o seguinte: duração de pulso 20 $\mu$ s, intervalo interpulsátil de 100 $\mu$ s, frequência de 100pps e amplitude em um nível submotor. A amplitude foi aumentada gradualmente até observar uma contração muscular visível e em seguida foi diminuída até um limiar imediatamente abaixo da contração muscular. Foi utilizada polaridade negativa com dois eletrodos ativos auto adesivos quadrados (1cm<sup>2</sup>), fixados com fita adesiva nas regiões lateral e medial da articulação tibiotársica. Um eletrodo dispersivo também auto adesivo retangular (9X3cm) foi mantido na região dorsal do tronco do animal. Durante a aplicação da corrente os animais foram mantidos deitados em ambiente aquecido para evitar a hipotermia gerada pela anestesia. Os animais dos grupos *inflamado+ EEAV(-)* e *inflamado + EEAV placebo* começaram imediatamente com o tratamento da EEAV após a injeção da carragenina e os do grupo normal + EEAV(-) após a tricotomia. Todos os animais destes três grupos receberam uma sessão diária de eletroestimulação ou placebo durante 45 minutos por 3 dias consecutivos.

## ANALISE ESTATISTICA

Foi aplicado o teste t de *student* pareado para determinar possíveis diferenças (inicial e final) no peso. A descrição e a comparação das variáveis por grupo de intervenção foi feita aplicando uma análise de variância (ANOVA) *one way*. Quando identificadas diferenças foi aplicado o teste *pos hoc* de Bonferroni.

Na dor foram analisadas as medianas e para estabelecer as diferenças entre os grupos foi aplicado um teste de Kruskal-Wallis. O volume e a dor também foram analisados por tempo com ANOVA de mensurações repetidas tipo *nested*. Os dados foram processados no software STATA 9,0 e foi determinado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

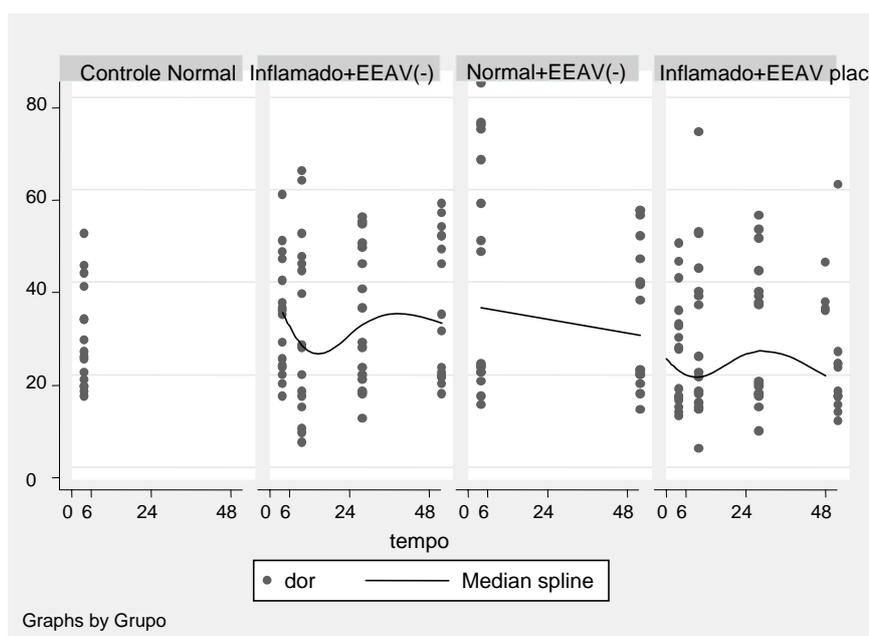
## RESULTADOS

### Peso corporal

Houve diferença entre o peso inicial e final em todos os grupos, com perda de peso nos três grupos que receberam intervenção, sendo esta maior no grupo *inflamado+EEAV(-)* ( $p < 0,05$ ).

### Dor

A comparação entre os grupos dos valores da LRP nos diferentes períodos avaliados não mostrou diferenças estatísticas entre eles ( $p > 0,05$ ; figura 2). O mesmo aconteceu na LRP mensurada ao início e no final do experimento nos grupos intervindos. Também não foram identificadas diferenças por tratamento e por período de avaliação ( $p = 0,09$  e  $p = 0,33$ , respectivamente. ANOVA de mensurações repetidas *nested*).

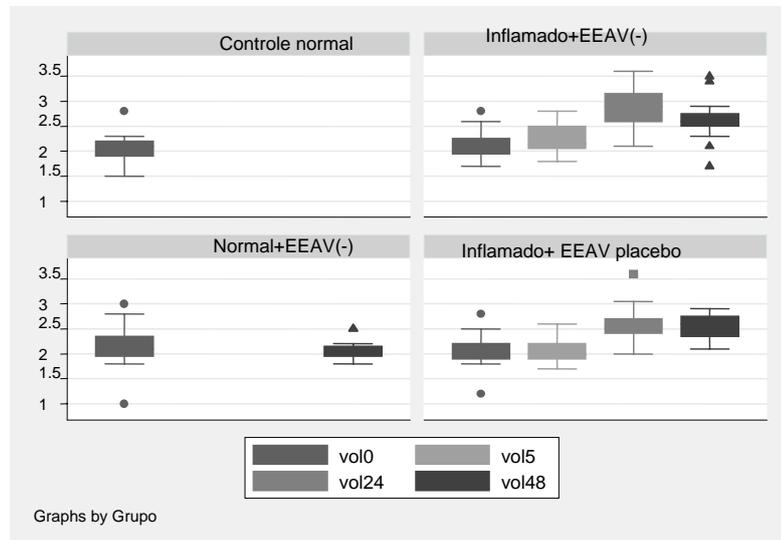


**Figura 2 .** Medianas das medidas de dor nos 4 grupos de tratamento durante as 48 horas de intervenção.

### Volume

Todos os grupos apresentaram volume similar da pata na avaliação inicial pré indução da inflamação ( $p = 0,65$ ). Houve aumento significativo no volume 24h, comparado ao período pré inflamatório nos grupos *inflamado+EEAV(-)* e *inflamado+EEAV placebo*, ( $p < 0,05$ ; Figura 3), sendo mantida esta diferença na avaliação 48h. No entanto, não houve diferença entre estes dois grupos em nenhum dos tempos avaliados. Não foram identificadas diferenças

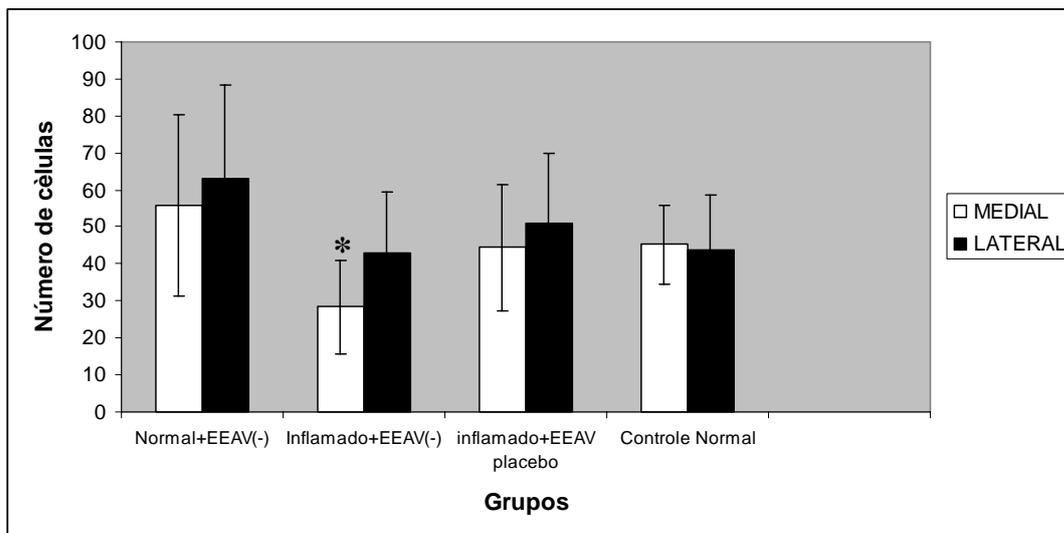
por tratamento ( $p=0,22$ ) ou por período de avaliação ( $p=0,057$ ) (ANOVA de mensurações repetidas *nested*).



**Figura 3.** Descritivo do volume (ml) por tempo e grupo de intervenção. vol0: volume período pré-inflamação; vol5: volume período 5 horas; vol24: volume período 24 horas; vol48: volume período 48 horas.

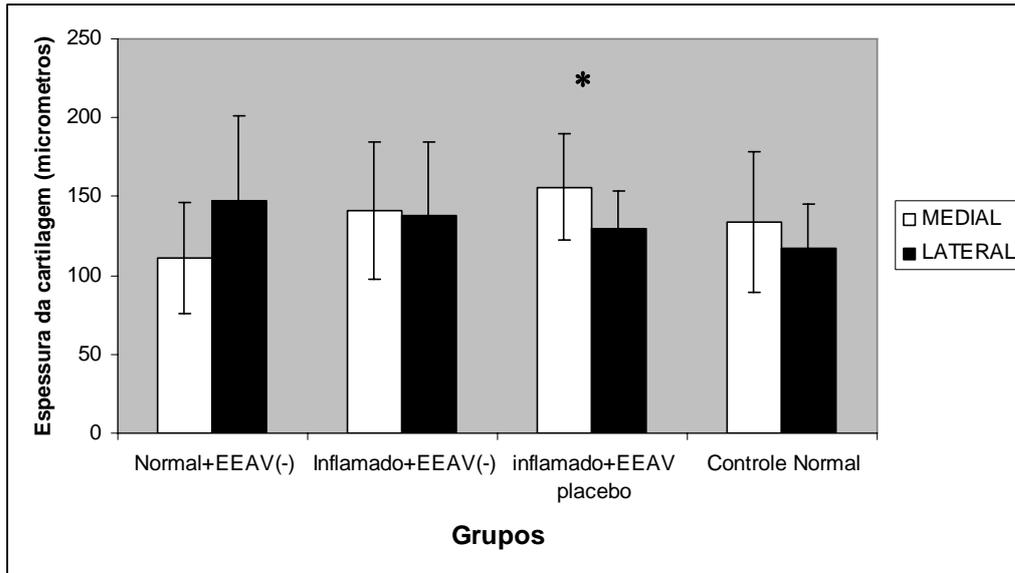
### Análise morfológica

Houve diferença entre os quatro grupos na quantidade de células na região medial da cartilagem do tornozelo acometido ( $p=0,006$ ). O teste *pos hoc* mostrou que o grupo *inflamado+EEAV(-)* teve uma menor celularidade com relação aos outros três grupos. Este grupo apresentou também uma menor quantidade de células na região medial com relação à lateral no membro acometido ( $p=0,03$ ; Figura 4).



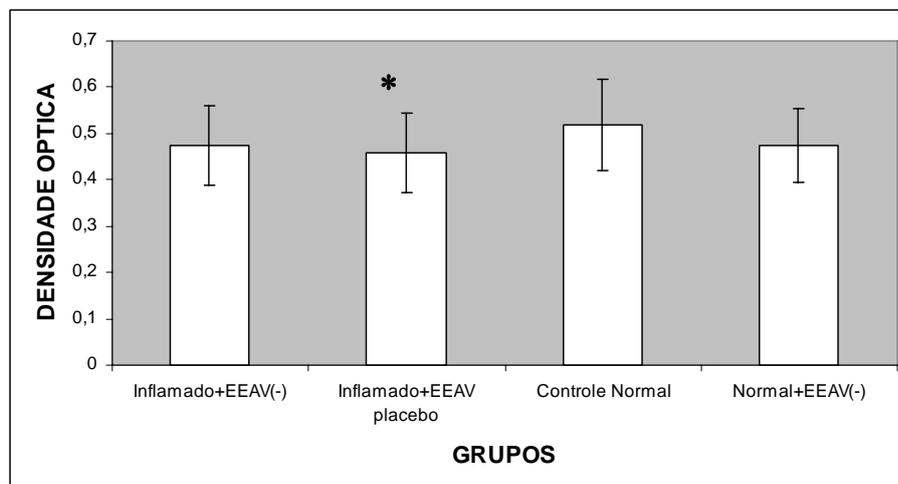
**Figura 4.** Número de células tornozelo acometido nos 4 grupos. Observa-se uma menor celularidade na região medial no grupo *inflamado+EEAV(-)* com relação à região lateral e aos outros três grupos  $p < 0,05$  (\*).

Na espessura da cartilagem somente o grupo *inflamado+EEAV placebo* teve diferença na região medial do tornozelo acometido com relação à região medial do tornozelo não acometido ( $p=0,01$ ). Ao comparar os três grupos que receberam intervenção houve uma diferença apenas marginal na região medial do tornozelo acometido ( $p=0,05$ ). O teste *pos hoc* mostrou que essa diferença foi gerada entre os grupos *inflamado+EEAV placebo* e *normal+EEAV(-)* ( $p=0,01$ ; Figura 5).



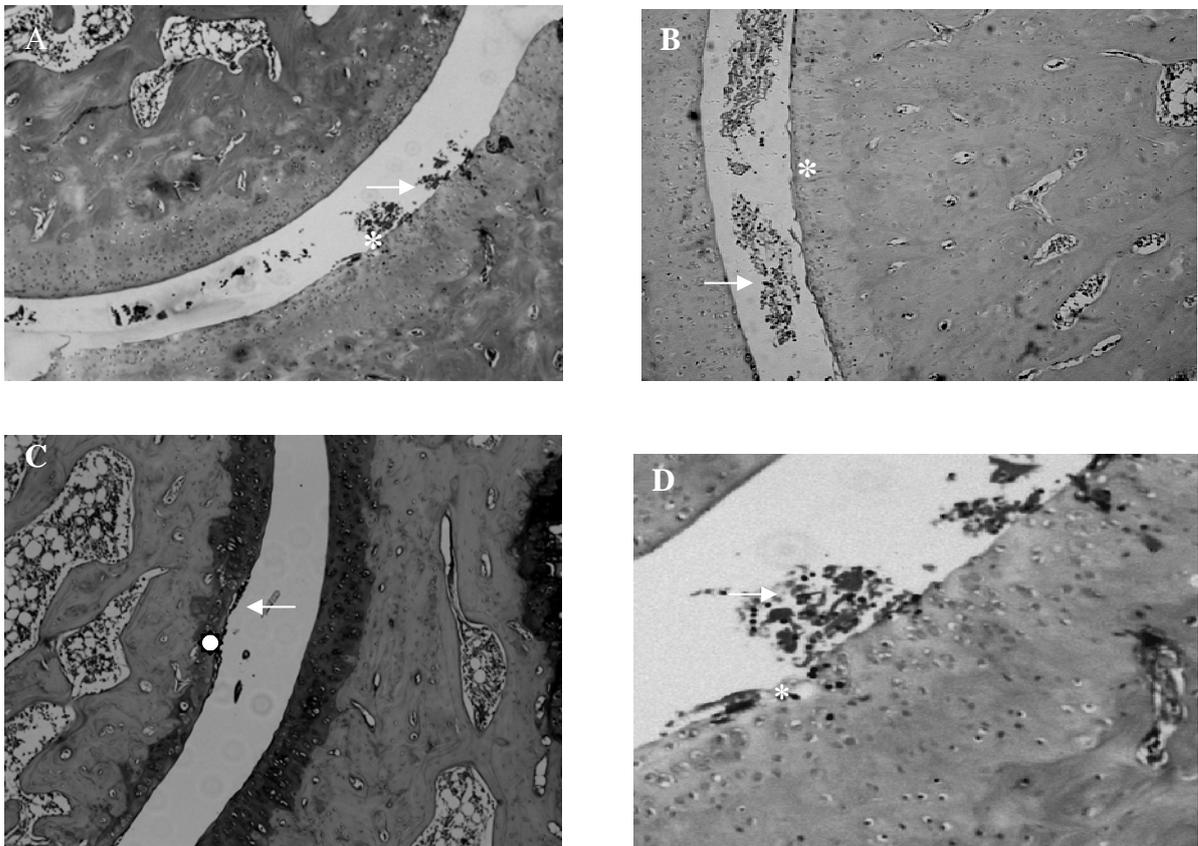
**Figura 5.** Espessura da cartilagem no tornozelo acometido nos 4 grupos. Nota-se a maior espessura da cartilagem da região medial do grupo *inflamado+EEAV placebo* com relação ao grupo *normal+EEAV(-)* (\*).

Os resultados da densidade óptica mostraram que não houve diferença entre as regiões medial e lateral em nenhum grupo, mas ao comparar a densidade total houve menor densidade no grupo *inflamado + EEVA placebo* com relação ao grupo *controle normal* ( $p=0,04$ ; Figura 6).



**Figura 6.** Densidade óptica da cartilagem no tornozelo acometido nos 4 grupos. Houve diferença significativa no grupo *inflamado + EEVA placebo* com relação ao *controle normal* (\*).

Na avaliação qualitativa o CCI deu como resultado 0,8 (IC 95%:0,59-0,92), mostrando uma alta reprodutibilidade intra-avaliador. Nesta avaliação no grupo *inflamado+EEAV(-)* foi encontrada diminuição do número de células na região medial do tornozelo acometido comparada com a região lateral, bem como menor ortocromasia para a safranina-O ( $p<0,05$ ). Também no mesmo grupo quando foi comparada a região medial do tornozelo acometido com a mesma região do tornozelo não acometido foram observadas maiores alterações da superfície e maior presença de *pannus* ( $p<0,05$ ; figura 7). No grupo placebo houve diminuição do número de células na região medial com relação à lateral no tornozelo acometido ( $p<0,05$ ).



**Figura 7.** Fotomicrografias da cartilagem articular tibial dos animais do grupo *inflamado+EEAV(-)*. A, B e D tingidas com HE e C com safranina-O. Nota-se a presença de *pannus* (→), fibrilação focal (\*) e diminuição da ortocromasia para Safranina-O (●).

Ao comparar a região medial entre todos os grupos encontrou-se diferença significativa na presença de *pannus* gerada entre os grupos *controle normal* e *inflamado+EEAV(-)* ( $p=0,002$  teste de Bonferroni). Na ortocromasia apresentaram-se maiores perdas na região medial do tornozelo acometido nos grupos submetidos a inflamação ( $p<0,05$  teste Bonferroni), mas sem diferença entre eles.

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo não mostraram efeito do tratamento da EEAV(-) no nível submotor, 45 minutos por dia, aplicada durante 3 dias consecutivos na dor e edema dos tornozelos dos ratos do grupo inflamado+EEAV(-), além disso estes animais apresentaram maiores alterações na cartilagem articular.

Em nosso estudo a *t*-carragenina foi utilizada para gerar inflamação, sendo um modelo de nocicepção aguda produzindo hiperalgesia primária no local da lesão. Em seguida são ativados os neurônios do corno dorsal os quais junto com o aumento da sensibilidade dos nociceptores periféricos manifestam-se em uma hiperalgesia secundária<sup>20-22</sup>. Em nossos resultados não houve diferença na dor nos grupos *inflamado+ EEAV placebo* e *inflamado + EEVA(-)*. Uma possível explicação poderia ser que a curta duração do pulso da EEAV não permitiu estimular os receptores A $\delta$  opiáceos ou as fibras A $\beta$  encarregadas de ativar a inibição das fibras transmissoras da dor na medula espinhal.

O processo inflamatório produzido pela carragenina no presente estudo foi similar ao descrito em trabalhos anteriores<sup>19,21,22,24</sup> que relatam presença de dor e edema nas primeiras 5 horas com persistência até às 24 horas e diminuição após esse período. A EEAV(-) não gerou uma maior diminuição do edema no grupo inflamado+EEAV(-) comparado com o grupo placebo. Pelo tanto, os nossos resultados não coincidem com os obtidos em estudos prévios<sup>17,18,25,26</sup>, onde foram encontradas diferenças significativas no edema da pata dos ratos induzida por trauma e tratada com EEAV. Algumas das possíveis causas destes resultados poderiam ser o modelo inflamatório utilizado que foi diferente aos estudos que mostraram diminuição do edema e o tempo de aplicação. Nos utilizamos 45 minutos por dia, comparado com 3 sessões diárias por dia de 30 minutos cada uma (1,5 a 2 h por dia)<sup>11,12,17</sup>. Esses resultados indicam que o tempo de aplicação poderia ser um parâmetro crítico na diminuição do edema, coincidindo com Mendel e Fish<sup>27</sup>.

São bem conhecidos os efeitos da carragenina nos tecidos articulares. Em estudos prévios encontrou-se que uma injeção desta substância produz na fase aguda presença principalmente de células polimorfonucleares no líquido sinovial, acompanhado por proliferação e infiltração da membrana sinovial com diminuição gradual do número de células no líquido sinovial após 24 horas da indução da inflamação<sup>28,29</sup>.

Em nosso estudo alguns desses efeitos foram apresentados nos grupos submetidos a inflamação. No grupo *inflamado+EEAV(-)* foi encontrada maior presença de *pannus* e portanto menor quantidade de células e diminuição da ortocromasia para a safranina-O,

principalmente na região medial que é sabidamente a zona de maior descarga de peso no tornozelo dos ratos. Enquanto no grupo *inflamado+EEAV placebo* houve menor densidade óptica da cartilagem e coerentemente apresentou-se uma menor ortocromasia para a safranina-O.

A densidade óptica determina o número de *pixels* correspondentes à cor vermelha produto da coloração por safranina-O, sendo esta um marcador dos glicosaminoglicanos e do metabolismo da cartilagem<sup>30</sup>. A menor densidade óptica no grupo *inflamado+EEAV placebo* resultado da avaliação quantitativa indica que este grupo teve uma maior perda de glicosaminoglicanos, o qual coincide com estudos prévios que reportaram diminuição da síntese e quantidade das proteoglicanas na cartilagem produzidas pela carragenina<sup>31</sup>.

O *pannus* é um tecido invasivo de granulação composto principalmente por macrófagos e fibroblastos e localiza-se na interfase entre o tecido sinovial e a cartilagem. Sua função é liberar enzimas colagenolíticas que contribuem com a destruição da cartilagem<sup>32</sup>. A presença de *pannus* não foi evitado pela EEAV(-), possivelmente pelo tipo de corrente caracterizado por uma curta duração do pulso e uma carga de fase pequena<sup>12</sup> (12-15 $\mu$ C) e adicionalmente pelo curto tempo de aplicação. Esses aspectos não permitiram gerar a proliferação celular observada em estudos *in vitro* e em animais, que utilizaram corrente direta a qual é polarizada e tem uma longa duração do pulso gerando efeitos eletroquímicos nos tecidos<sup>8,10</sup>.

Estes efeitos nos tecidos articulares dos animais inflamados e tratados com EEAV(-) foram coerentes com os resultados da avaliação dos sinais da inflamação, sugerindo que esta corrente não é a mais indicada para o tratamento de lesões inflamatórias articulares em fase aguda. Para estudos futuros sugere-se a aplicação desta corrente em sessões mais duradouras e durante períodos mais longos de tratamento, além de incluir a quantificação do colágeno na cartilagem.

## CONCLUSÃO

A EEVA(-) com os parâmetros usados e aplicada no tornozelo de ratos com inflamação articular aguda gerada por carragenina não conseguiu diminuir o edema e a dor bem como evitar as alterações na cartilagem.

## REFERÊNCIAS

1. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization* 2003;81: 646-656.
2. Ottawa panel evidence-based clinical practice guidelines for electrotherapy and thermotherapy interventions in the management of rheumatoid arthritis in adults. *Phys Ther* 2004;84:1016-1043.
3. Osiri M, Welch V, Brosseau L, Shea B, McGowan J, Tugwell P, Wells G. Transcutaneous electrical nerve stimulation for knee osteoarthritis (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2000;4:1-26.
4. Brosseau L, Yonge KA, Robinson V, Marchand S, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for the treatment of rheumatoid arthritis in the hand. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003,2:1-18.
5. Baker B, Spadaro J, Marino A, Becker RO. Electrical stimulation of articular cartilage regeneration. *Ann NY Acad Sci* 1974;238:491-499.
6. Lippiello L, Chakkalakal D, Connolly JF. Pulsing direct current-induced repair of articular cartilage in rabbit osteochondral defects. *J Orthop Res* 1990;8:266-275.
7. Aaron RK, Ciombor DC, Wangs SB. Clinical biophysics: the promotion of skeletal repair by physical forces. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068: 513-531.
8. Akai M, Hayashi K. Effect of electrical stimulation on musculoskeletal systems; a meta-analysis of controlled clinical trials. *Bioelectromagnetics* 2002;23:132-143.
9. Haddad JB, Obolensky AG, Shinnick P. The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and a review of earlier work. *J of Alternative and Complementary Med* 2007;13:485-490.
10. Nogami H, Aoki H, Okagawa T, et al. Effects of electric current on chondrogenesis in vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1982;163: 243-247.
11. Brighton CT, Wang W, Clark CC. Up-regulation of matrix in bovine articular cartilage explants by electric fields. *Biochem and Biophys Res Comm* 2006;342:556-551.
12. Davini R, Nunes CV, Guirro ECO, Guirro RRJ. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Rev Bras Fisioter.* 2005;9:249-256.
13. Omote K, Kawamata T, Naka Yama Y, et al: Effects of a Novel Selective Agonist for Prostaglandin Receptor Subtype EP4 on Hyperalgesia and Inflammation in Monoarthritic Model. *Anesthesiology* 2002;97;170-176.
14. Wang Y, Huang C, Cao Y, Han Y. Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sci* 2000;67;261-267.

15. Karges JR, Mark BE, Stikeleather SJ, Worrell TW: Concurrent Validity of Upper-Extremity Volume Estimates: Comparison of Calculated Volume Derived From Girth Measurements and Water Displacement Volume. *Phys Ther* 2003;83:134–145.
16. Moholkar, K., Fenelon, G. Normal volume of the foot and ankle. *The Foot* 2001; 11: 63-65.
17. Dolan MG, Graves P, Nakazawa C, Delano T, et al: Effects of ibuprofen and high-voltage electric stimulation on acute edema formation after blunt trauma to limbs of rats. *J Athl Train* 2005;40:111-115.
18. Dolan MG, Mychaskiw AM, Mendel FC: Cool-water immersion and high-voltage electric stimulation curb edema formation in rats. *J Athl Train* 2003;38:225 -230.
19. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C: A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-88.
20. Sluka KA, Bailey K, Bogush J, Olson R, Ricketts A: Treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint. *Pain* 1998; 77:97–102.
21. Gopalkrishnan P, Sluka KA. Effect of Varying Frequency, Intensity, and Pulse Duration of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on Primary Hyperalgesia in Inflamed Rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2000; 81:984-990.
22. Sluka KA, Christy MR, Peterson WL, Rudd SL, Troy SM. Reduction of pain-related with either cold or heat treatment in an animal model of acute arthritis. *Arch Phys Med Rehabil* 1999;80:313-317.
23. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg* 1971;53A:523-537.
24. Salvemini D, Wang Z, Wyatt PS, Bourdon DM. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan – induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 829 – 838.
25. Taylor K, Mendel FC, Fish DR, Hard R, Burton HW: Effect of high-voltage pulsed current and alternating current on macromolecular leakage in hamster cheek pouch microcirculation. *Phys Ther* 1997;77:1729-1740.
26. Thornton RM: Effects of electrical stimulation on edema formation in different strains of rats. *Phys Ther* 1998;78:386-394.
27. Mendel FC, Fish DR: New perspectives in edema control via electrical stimulation. *J Athl Train* 1993;28:63-74.
28. Hansra P, Moran EL, Fornasier VL, Bogoch ER. Carrageenan-induced arthritis in the rat. *Inflammation* 2000;24:141-155.

29. Santer V, Sriratana A, Lowther DA. Carrageenin-induced arthritis:V. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1983;13:160-168.
30. Hylleste JL, Veje K, Ostergaard K. Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage – a review. *Osteoarthritis and cartilage* 2002;10:333-343.
31. Gillard GC, Lowther DA. Carrageenin-induced arthritis II. Effect of intraarticular injection of carrageenin on the synthesis of proteoglycan in articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism* 1976;19:918-922.
32. Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato, T, et al. Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. *Osteoarthritis and cartilage* 2003;11:133-140.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados dos estudos apresentados não mostraram efetividade da estimulação elétrica de alta voltagem com os parâmetros selecionados. Por esta razão propõem-se para futuros estudos os seguintes tópicos:

- Determinar os efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem nos níveis de histamina em estudos em humanos
- Avaliar outros marcadores da inflamação como a IL-6, IL-8 e TNF $\alpha$
- Aumentar o tempo de aplicação em estudos experimentais com animais e em humanos
- Mensurar os níveis de histamina no local de aplicação da estimulação elétrica