

**Artigo original**

# Avaliação do ultrassom sobre a hiperalgesia e o edema em joelhos de rato Wistar e interferências de um inibidor de opioides endógenos

## *Ultrasound evaluation on hyperalgesia and edema in knees of Wistar rats and interference of an endogenous opioid inhibitor*

Cintia Cristina Santi Martignano\*, Lígia Inez da Silva\*\*, Anamaria Meireles\*\*, Bruno Pogorzski Rocha\*\*, Camila Thieimi Rosa\*\*, Gladson Ricardo Flor Bertolini, D.Sc.

.....  
*\*Especialista em Fisioterapia Ortopédica e Traumatológica, \*\*Acadêmicos de Fisioterapia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), \*\*\*Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)*

### Resumo

Dentre os tratamentos para a osteoartrite o ultrassom terapêutico é utilizado, apesar de resultados controversos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da utilização do ultrassom em joelhos, de ratos Wistar, irritados quimicamente, analisando a nocicepção e edema, e se esses efeitos sofrem interferências pela aplicação de naloxone. Foram analisados 21 ratos Wistar, divididos em: GC – hiperalgesia e não tratados; GU – hiperalgesia e tratados com ultrassom; e GUN – hiperalgesia, com prévia injeção de naloxone e posterior ultrassom. A hiperalgesia foi induzida com 100µl de formalina 5%, no espaço tibiofemoral direito. Nos animais do GUN foi injetado 1µg de cloridrato de naloxone no espaço tibiofemoral direito 15 minutos antes da hiperalgesia. O tratamento consistiu em 2 aplicações de ultrassom. Para avaliação da hiperalgesia foi utilizado o filamento de Von Frey Digital, e para o edema um paquímetro metálico. As avaliações foram realizadas: pré-lesão (AV1); após 15 (AV2), 30 (AV3), 60 (AV4) e 120 (AV5) minutos da hiperalgesia. Os resultados mostraram aumento no diâmetro do joelho e diminuição do limiar aos estímulos nociceptivos em todos os grupos, sendo que apenas para a nocicepção GU apresentou aumento do limiar em AV5. Conclui-se que a analgesia do ultrassom sofreu interferência com a naloxone.

**Palavras-chave:** medição da dor, edema, modalidades de fisioterapia.

### Abstract

Among the osteoarthritis treatments the therapeutic ultrasound it's been used, although conflicting results. The aim of this study was to evaluate the ultrasound effects in knees of rats, irritated chemically, analyzing the nociception and swelling, and if these effects suffer interference from the naloxone application. Twenty one Wistar rats were analyzed, split into: GC – hyperalgesia but not treated; GU – hyperalgesia and treated with ultrasound; and GUN – hyperalgesia, with prior injection of naloxone and subsequent ultrasound. The hyperalgesia was induced with 100 µL of 5% formalin in the right tibiofemoral space. In the GUN animals naloxone 1 µg was injected in the right tibiofemoral space, 15 minutes prior to the hyperalgesia. The treatment consisted of two ultrasound applications. For hyperalgesia assessment Von Frey Digital filament was used and metallic caliper for the edema. The evaluations were performed: pre-injury (EV1), after 15 (EV2), 30 (EV3), 60 (EV4) and 120 (EV5) minutes of hyperalgesia. The results showed an increasing in knee diameter and threshold decreasing to nociceptive stimuli in all groups, and only for GU nociception showed a threshold increase in the EV5. It is concluded that ultrasound analgesia suffered interference with naloxone.

**Key-words:** pain measurement, edema, physical therapy modalities.

Recebido em 6 de novembro de 2012; aceito em 14 de junho de 2013.

**Endereço de correspondência:** Gladson Ricardo Flor Bertolini, Rua Universitária, 2069. Jardim Universitário, 85819-110 Cascavel PR, E-mail: gladson\_ricardo@yahoo.com.br

## Introdução

A dor é conceituada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com uma lesão tecidual presente ou potencial, ou descrita em relação a essa lesão” [1]. Em certas ocasiões, a excitação das fibras da dor torna-se progressivamente maior. À medida que o estímulo doloroso continua, esse aumento da sensibilidade dos nociceptores é chamado de hiperalgesia ou hipernocicepção [2].

O edema é definido como um aumento de volume ou tumefação, formado pelo extravasamento de elementos para o exterior dos vasos e a intensidade deste extravasamento estará correlacionado com o tipo e o grau da agressão tecidual [3].

Dentre as doenças articulares que apresentam como sintomas a dor e edema, encontra-se a Osteoartrite (OA), ela é considerada uma das doenças mais comuns do sistema esquelético e pode ser definida como uma condição degenerativa que afeta as articulações sinoviais [4]. A osteoartrite em joelho é a causa mais comum de incapacidade para deambulação, com níveis crescentes de incidência e prevalência [5,6].

A dor da OA pode ser tratada com anti-inflamatórios (esteroides e não), opioides, acupuntura, laser de baixa potência, estimulação elétrica transcutânea, capsaicina e ultrassom (US) terapêutico [7,8], e em casos mais graves com a substituição da articulação por artroplastia [9].

O ultrassom é provavelmente o agente eletrofísico mais usado na prática fisioterapêutica. Enquanto no passado, seu principal uso foi térmico, atualmente, os chamados efeitos não-térmicos são os que merecem mais atenção e destaque. Seu uso predominante tem sido em relação ao reparo tecidual, em que há evidências suportando sua aplicação em fases inflamatórias, proliferativas e remodelamento [10]. O efeito analgésico do ultrassom é creditado à regeneração tecidual e a elevação do limiar de despolarização das terminações nervosas livres, ocorrida por alteração na concentração de  $\text{Na}^{2+}$  intracelular [11].

Várias estruturas anatômicas envolvendo, principalmente o sistema nervoso central, são responsáveis pela percepção dolorosa. Os opioides endógenos atuam em receptores próprios, inibindo a sensação dolorosa [12]. Os receptores de opioides endógenos são macromoléculas específicas no tecido alvo, que se ligam às drogas, resultando desta ligação sua atividade biológica. Quando uma droga desencadeia esta reação é chamada de agonista; se a interação não desencadeia nenhum efeito, mas impede o acesso de qualquer agonista, a substância é chamada de antagonista [13]. Dentre os receptores endógenos a naloxone é um antagonista do receptor opioide comumente utilizado em pesquisas [14].

Visto que ainda existem incertezas com relação aos mecanismos de modulação da dor pelo ultrassom terapêutico, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do ultrassom sobre a hiperalgesia e o edema em joelhos de rato Wistar, e se esses efeitos sofreriam interferências pela aplicação de um inibidor de opioide endógenos, como a naloxone.

## Material e métodos

### Amostra e grupos experimentais

Foram analisados 21 ratos, da linhagem Wistar, machos, com massa corporal de  $433,60 \pm 33,19\text{g}$ , obtidos do Biotério Central da Unioeste e mantidos em gaiolas de polipropileno, com livre acesso a água e ração *ad libitum*, com ciclo claro/escuro controlado de 12 horas e temperatura ambiente controlada ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ). O estudo foi conduzido segundo as normas internacionais de ética em experimentação animal, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal, sob número 00912.

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos:

- Grupo Controle (GC,  $n = 7$ ) – composto por animais submetidos à hiperalgesia no joelho direito e não tratados;
- Grupo Ultrassom (GU,  $n = 7$ ) – submetidos à hiperalgesia no joelho direito e tratados com ultrassom;
- Grupo Ultrassom + Naloxone (GUN,  $n = 7$ ) – submetidos à hiperalgesia no joelho direito, com prévia injeção de naloxone e posterior ultrassom.

### Modelo experimental de indução de hiperalgesia

Os animais foram contidos manualmente e injetado no espaço articular tibiofemoral  $100\mu\text{l}$  de solução de formalina 5%, para a indução de hiperalgesia, com seringa para aplicação de insulina (30G).

### Aplicação de naloxone

Nos animais do GUN foi injetado  $1\mu\text{g}$  de cloridrato de Naloxone (Narcan  $0,4\text{mg/ml}$ , Cristalia<sup>®</sup>), no espaço articular tibiofemoral direito, 15 minutos antes da indução da hiperalgesia. Para GC e GU foi injetada solução de soro fisiológico 9%.

### Avaliação da nocicepção

Para avaliação da hiperalgesia foi utilizado o equipamento filamento de Von Frey Digital (Insight<sup>®</sup>), o qual é usado para avaliar a nocicepção ao estímulo mecânico em animais. O teste foi realizado com o animal contido manualmente e o filamento aplicado na face medial da articulação tibiofemoral do membro posterior direito. A ponta de polipropileno do filamento foi aplicada perpendicularmente à área, com gradual aumento de pressão, e, logo que o animal retirou o membro, o teste foi interrompido para o registro do limiar de retirada. Foram coletados os valores de pressão (em gramas) no momento pré-lesão (AV1), após 15 (AV2), 30 (AV3), 60 (AV4) e 120 (AV5) minutos da indução da hiperalgesia.

## Avaliação do edema

Para quantificar o edema (em centímetros) na região da lesão experimental, foi utilizado paquímetro metálico, que foi precisamente posicionado na região da interlinha articular do joelho, utilizada como ponto de referência, realizando as medidas em sentido látero-medial. As coletas de dados foram realizadas sempre pelo mesmo avaliador, para esta avaliação utilizou-se o lado esquerdo como referência, visto que no mesmo não foi realizada nenhuma intervenção.

## Protocolo de tratamento com ultrassom

Após a AV2, iniciou-se o tratamento, utilizando o equipamento de ultrassom marca Ibramed, com 1 cm<sup>2</sup> de área de radiação efetiva (ERA) e frequência de 1 MHz, dose de 0,4 W/cm<sup>2</sup>, com calibração prévia do aparelho. A aplicação do ultrassom se deu precisamente sobre o local da lesão. Utilizou-se gel hidrossolúvel como meio acoplador, mantendo-se movimentos circulatorios lentos e rítmicos do cabeçote durante o tempo de aplicação de três minutos.

O tratamento consistiu em duas aplicações: após o AV2 e AV4, sendo que os animais do GC receberam a aplicação do equipamento desligado. Após a última avaliação (duas horas após a lesão), todos os animais foram eutanasiados.

## Análise estatística

Foi realizada a análise intragrupos com o teste de ANOVA com medidas repetidas e unidirecional para comparação entre os grupos, com pós-teste de Tukey. Em todos os casos o nível de significância foi de 5%.

**Tabela I** - Valores observados para o teste de retirada do membro, para os diferentes grupos (GC – grupo controle; GU – grupo ultrassom; GUN – grupo ultrassom + naloxone), nos diferentes momentos de avaliação (AV). Dados apresentados em média e desvio-padrão.

	AV1	AV2	AV3	AV4	AV5
GC	193,4 ± 18,93	86,84 ± 15,94*	81,73 ± 18,45*	93,13 ± 17,27*Φ	108,8 ± 19,09*Φ
GU	212,3 ± 38,98	90,41 ± 26,34*	79,60 ± 26,28*	131,9 ± 11,62*	143,3 ± 27,66*●
GUN	180,1 ± 30,26	93,54 ± 19,77*	74,17 ± 16,37*	95,87 ± 17,68*Φ	109,5 ± 21,33*Φ

\*diferença significativa ao comparar com o valor de AV1; ● diferença significativa ao comparar com o valor de AV2. Φ diferença significativa na comparação com GU, no mesmo momento de avaliação.

**Tabela II** - Valores observados para a medida do diâmetro dos joelhos, para os diferentes grupos (GC – grupo controle; GU – grupo ultrassom; GUN – grupo ultrassom + naloxone), nos diferentes momentos de avaliação (AV).

	GC		GU		GUN	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
AV1	1,32 ± 0,23Φ	1,23 ± 0,06Φ	1,07 ± 0,05Φ	1,13 ± 0,04Φ	1,20 ± 0,06	1,17 ± 0,05
AV2	1,60 ± 0,24*	1,21 ± 0,08●	1,64 ± 0,11*Φ	1,16 ± 0,04●	1,39 ± 0,09*Φ	1,10 ± 0,04●
AV3	1,69 ± 0,13*	1,14 ± 0,07●Φ	1,67 ± 0,07*	1,12 ± 0,04●	1,61 ± 0,16*	1,17 ± 0,06●Φ
AV4	1,66 ± 0,14*	1,17 ± 0,05●	1,60 ± 0,13*	1,13 ± 0,05●	1,69 ± 0,13*	1,16 ± 0,06●
AV5	1,76 ± 0,12*	1,16 ± 0,05●	1,68 ± 0,10*	1,15 ± 0,05●	1,62 ± 0,14*	1,15 ± 0,08●

\*Diferença significativa ao comparar com o valor obtido em AV1 (ipsilateral); ● diferença significativa ao comparar com o contralateral. Φ diferença significativa entre grupos no mesmo lado.

## Resultados

### Avaliação nociceptiva

Na comparação entre os grupos, foi possível observar que nenhum grupo apresentou valores retornando ao basal, porém, o grupo que recebeu apenas ultrassom apresentou aumento significativo do limiar de retirada em AV5 ao comparar com AV2 (Tabela I). Quando realizada a comparação entre os grupos, houve aumento significativo dos valores encontrados para GU, comparado com os outros dois grupos, tanto em AV4 quanto em AV5.

### Avaliação do edema

A Tabela II nos mostra que na avaliação da presença de edema observou-se que após a injeção com formalina (entre AV1 e AV2) ocorreu um aumento estatisticamente significativo no diâmetro da pata direita nos três grupos, confirmando a lesão. Nos GC e GU a formação do edema deu-se apenas entre as AV1 e AV2, já no GUN, esse aumento foi significativo também entre AV2 e AV3.

Ao realizar a comparação entre os grupos, a variável edema, mostrou um aumento significativo do diâmetro da pata do GU quando comparado com GUN na AV2 (Tabela II).

## Discussão

O ultrassom contínuo vem sendo usado como intuito de aquecer os tecidos, diminuir a dor, a inflamação, a rigidez articular, o espasmo muscular, facilitar o estiramento das fibras de colágeno e aumentar o fluxo sanguíneo [11].

O presente estudo avaliou os efeitos da utilização do ultrassom nas alterações sobre a dor e o edema em joelhos de rato Wistar, e se esses efeitos poderiam sofrer interferências pela aplicação de um inibidor de opioides endógenos, como a naloxone. Para este intento foi utilizado um modelo de irritação articular, por injeção de formalina, que apresenta uma fase de latência, por volta do 5º ao 10º minuto [15], assim, preferiu-se realizar a segunda avaliação após 15 minutos da irritação química, evitando-se tal fase.

Com os parâmetros utilizados foi possível vislumbrar efeitos analgésicos após 2 aplicações, visto que houve um aumento do limiar após 120 minutos, quando comparado com a avaliação ocorrida 15 minutos após injeção de formalina, fato que não ocorreu para nenhum dos outros grupos. Além disso, também se encontrou diferenças significativas entre GU com GC e GUN para as avaliações ocorridas após 60 e 120 minutos, sendo que em todos os casos os valores apontados para GU apresentaram maiores limiares à pressão.

O efeito analgésico do ultrassom é relatado em experimentos com animais [16-18] e em humanos [19]. Contudo, não há total consenso, tanto de seu efeito analgésico [20-26], quanto da forma que o mesmo produz seus efeitos. Uma das possíveis ações é a hipertermia, mas, segundo Watson [10] a temperatura deve ser elevada a cerca de 40-45º C por ao menos 5 minutos, desta forma no presente estudo descartar-se tal possibilidade. Ainda, efeitos terapêuticos do ultrassom podem ocorrer devido aos chamados efeitos não térmicos, principalmente por ativação celular com alterações na permeabilidade de membrana [10]. No presente estudo observou-se que a ação de um antagonista opioide, naloxone, eliminou a ação analgésica que o mesmo havia apresentado. Hagiwara *et al.* [27] mostram que o laser produz liberação por parte de leucócitos de seus conteúdos de opioides endógenos, assim, acredita-se que o ultrassom, com seus efeitos não térmicos, pode produzir resultados semelhantes, por sua ativação de leucócitos circulantes no local da lesão, visto que a dose e via de administração de naloxone utilizadas apresentam características de ação periféricas [28]. Tal fato corrobora os estudos de Meireles *et al.* [14] e Serra *et al.* [28], realizados com o uso associado de naloxone e laser de baixa potência.

Na avaliação para a variável edema no membro posterior direito do animal foi observada a presença significativa do mesmo em todos os grupos logo após a indução da lesão. De forma semelhante Franco *et al.* [29] avaliaram o efeito do ultrassom terapêutico em edema e não conseguiram confirmar a eficácia do mesmo na resolução de edema induzido por carragenina em pata de ratos, mesmo utilizando técnicas (subaquático e contato) e doses diferentes (0,3 W/cm²). Deve-se levar em consideração que os efeitos clínicos parecem ser dose-dependente da intensidade [10] e, assim, a intensidade usada pode ter sido incapaz de promover os efeitos, já que pelo momento agudo de aplicação da terapia, poder-se-ia imaginar um aumento do mesmo após a aplicação terapêutica, visto as ações pró-inflamatórias deste recurso.

Ressaltam-se como limitações deste estudo, a não realização de análises bioquímicas e histológicas que poderiam de forma mais fidedigna apontar os mecanismos envolvidos na analgesia e formação de edema, sendo assim sugestões para futuros estudos.

## Conclusão

O tratamento com ultrassom terapêutico apresentou diminuição na nocicepção, mas, antagonizado com aplicação de naloxone. Para a formação do edema não houve efeitos pronunciados da terapia.

## Referências

1. International Association for the Study of Pain. IASP taxonomy. [citado 2012 Mai 10]. Disponível em URL: <http://www.iasp-pain.org>
2. Lana CA, Paulino CA, Gonçalves ID. Influência dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. *Rev Bras Med Esporte* 2006;12(5):248-54.
3. Resende MA, Pereira LSM, Castro MSA. Proposta de um modelo teórico de intervenção fisioterapêutica no controle da dor e inflamação. *Fisioter Bras* 2005;6(5):268-71.
4. Silva ALP, Imodo DM, Croci AT. Estudo comparativo entre a aplicação de crioterapia, cinesioterapia e ondas curtas no tratamento da osteoartrite de joelho. *Acta Ortop Bras* 2007;15(4):204-9.
5. Suri P, Morgenroth DC, Hunter DJ. Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities. *PM R* 2012;4(5 Suppl):S10-9.
6. Douglas RJ. Corticosteroid injection into the osteoarthritic knee: drug selection, dose, and injection frequency. *Int J Clin Pract* 2012;66(7):699-704.
7. De Luigi AJ. Complementary and alternative medicine in osteoarthritis. *PM R*. 2012;4(5 Suppl):S122-33.
8. Gazi MCB, Issy AM, Sakata RK. Estudo comparativo da analgesia entre bupivacaína e morfina intra-articular em osteoartrite de joelho. *Rev Bras Anestesiol* 2005;55(5):491-9.
9. Grayson CW, Decker RC. Total joint arthroplasty for persons with osteoarthritis. *PM R* 2012;4(5 Suppl):S97-103.
10. Watson T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics* 2008;48(4):321-9.
11. Bishop S, Draper DO, Knight KL, Feland JB, Eggett D. Human tissue-temperature rise during ultrasound treatments with the aquaflex gel pad. *J Athl Train* 2004;39(2):126-31.
12. Daudt AW, Hadlich E, Facin MA, Aprato RMS, Pereira RP. Opióides no manejo da dor — uso correto ou subestimado? Dados de um hospital universitário. *Rev Ass Med Bras* 1998;44(2):106-10.
13. Gozzani JL. Opióides e antagonistas. *Rev Bras Anestesiol* 1994;44(1):65-73.
14. Meireles A, Rocha BP, Rosa CT, Silva LI, Bonfleur ML, Bertolini GRF. Avaliação do papel de opioides endógenos na analgesia do laser de baixa potência, 820 nm, em joelho de ratos Wistar. *Rev Dor* 2012;13(2):152-5.

15. Martins MA, de Castro Bastos L, Tonussi CR. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *J Pain* 2006;7(2):100-7.
16. Ciena AP, Cunha NB, Moesch J, Mallmann JS, Carvalho AR, Moura PJ, et al. Efeitos do ultrassom terapêutico em modelo experimental de ciatalgia. *Rev Bras Med Esporte* 2009;15(6):424-7.
17. Ciena AP, Oliveira JJJ, Cunha N B, Bertolini GRF. Ultra-som terapêutico contínuo térmico em modelo experimental de ciatalgia. *Fisioter Pesqui* 2009;16(2):173-7.
18. Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikizceli I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Lasers Surg Med* 2004;35(1):84-9.
19. Ay S, Doğan SK, Evcik D, Başer OC. Comparison the efficacy of phonophoresis and ultrasound therapy in myofascial pain syndrome. *Rheumatol Int* 2011;31(9):1203-8.
20. van den Bekerom MP, van der Windt DA, Ter Riet G, van der Heijden GJ, Bouter LM. Therapeutic ultrasound for acute ankle sprains. *Eur J Phys Rehabil Med* 2012;48(2):325-34.
21. van der Windt DA, van der Heijden GJ, van den Berg SG, ter Riet G, de Winter AF, Bouter LM. Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review. *Pain* 1999;81(3):257-71.
22. Shanks P, Curran M, Fletcher P, Thompson R. The effectiveness of therapeutic ultrasound for musculoskeletal conditions of the lower limb: A literature review. *Foot* 2010;20(4):133-9.
23. Loyola-Sánchez A, Richardson J, MacIntyre NJ. Efficacy of ultrasound therapy for the management of knee osteoarthritis: a systematic review with meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(9):1117-26.
24. Calis HT, Berberoglu N, Calis M. Are ultrasound, laser and exercise superior to each other in the treatment of subacromial impingement syndrome? A randomized clinical trial. *Eur J Phys Rehabil Med* 2011;47(3):375-80.
25. Fiore P, Panza F, Cassatella G, Russo A, Frisardi V, Solfrizzi V, et al. Short-term effects of high-intensity laser therapy versus ultrasound therapy in the treatment of low back pain: a randomized controlled trial. *Eur J Phys Rehabil Med* 2011;47(3):367-73.
26. Santamato A, Solfrizzi V, Panza F, Tondi G, Frisardi V, Leggin BG, et al. Short-term effects of high-intensity laser therapy versus ultrasound therapy in the treatment of people with subacromial impingement syndrome: a randomized clinical trial. *Phys Ther* 2009;89(7):643-52.
27. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Noguchi T. Pre-Irradiation of blood by gallium aluminum arsenide (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. *Anesth Analg* 2008;107(3):1058-63.
28. Serra AP, Ashmawi HA. Influência da naloxona e metisergida sobre o efeito analgésico do laser em baixa intensidade em modelo experimental de dor. *Rev Bras Anesthesiol* 2010;60(3):302-10.
29. Franco AD, Pereira LE, Groschitzki M, Aimbire F, Martin RABL, Carvalho RA. Análise do efeito do ultra-som no edema inflamatório agudo: estudo experimental. *Fisioter Mov* 2005;18(2):19-24.