



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIA E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

DANIELA DE ESTÉFANI

**EFEITO DE DIFERENTES FREQUÊNCIAS DE CRIOTERAPIA EM
MARCADORES DE REPARO TECIDUAL APÓS LESÃO POR CONTUSÃO EM
RATOS WISTAR**

Araranguá
2020

Daniela de Estéfani

**Efeito de diferentes frequências de crioterapia em marcadores de reparo tecidual após
lesão por contusão em ratos wistar**

Dissertação submetida ao Programa de pós Graduação
em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em
Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Haupenthal

Araranguá

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Estéfani, Daniela

Efeito de diferentes frequências de crioterapia em marcadores de reparo tecidual após lesão por contusão em ratos wistar / Daniela de Estéfani ; orientador, Alessandro Haupenthal, 2020.

58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Araranguá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Araranguá, 2020.

Inclui referências.

1. Ciências da Reabilitação. 2. Lesão muscular. . 3. Terapia por frio. . 4. Inflamação. . 5. Estresse oxidativo.. I. Haupenthal, Alessandro. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação. III. Título.

Daniela de Estéfani

Efeito de diferentes frequências de crioterapia em marcadores de reparo tecidual após lesão por contusão em ratos wistar

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Paulo César Lock Silveira, Dr.
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof. Rafael Cipriano Dutra, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rafael Inácio Barbosa, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências da Reabilitação.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Alessandro Haupental, Dr.
Orientador

Araranguá, 2020.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos, reconhecendo a grandeza de Deus em minha vida. A jornada não é fácil, não se trata apenas de comprometimento e dedicação ao que se propõe contribuir na área de estudo, mas são todas as adversidades que você enfrenta para chegar nesta etapa. Saber da existência de Deus me dá muita força para seguir. Força para saber que se estou aqui é porque mereço estar, mas também humildade para reconhecer que não vim sozinha. Ao longo da caminhada, muitos se fizeram presentes de inúmeras formas e me ajudaram para que esse dia pudesse chegar. Para estes, dedico este trabalho e por eles serei eternamente grata!

Dedico à minha mãe, ela que mesmo sem entender por quê eu me formei, mas não sai da Universidade, me apoiou incondicionalmente. Lembro-me de quando ainda estava em casa, pensar em formas de lhe ajudar e tornar sua vida mais confortável. Como toda escolha, temos de arcar com as renúncias; estou em busca deste objetivo, mas com a saudade diária do seu abraço. Dedico ao meu pai de coração, ele que me adotou aos três anos e desde então me ensina preciosas lições. Obrigada por me alfabetizar, me mostrar a importância de estudar e incentivar a leitura quando pequena.

Obrigada ao meu grande amor e parceiro de vida, Guilherme. Uma vida é pouco para viver ao seu lado. Obrigada por tornar meus dias mais leves, por saber o momento de me envolver no teu abraço e o momento de me incentivar a conquistar o mundo. Obrigada por permitir que este sonho pudesse se tornar realidade, contribuindo como pôde e não medindo esforços para isso. Obrigada por todas as trocas de conhecimento, por aceitar ficar acordado até tarde para me acompanhar e incentivar a concluir parte deste trabalho. Obrigada por aceitar meu silêncio e os momentos em que me passo no café e falo pelos cotovelos. Que nossa história seja longa e eu possa em cada capítulo da sua vida estar presente para vibrar suas conquistas como você vibra as minhas.

Agradeço aos meus amigos, àqueles que me acompanham desde a infância, os que fiz ao longo da vida e os que a UFSC me presenteou... Obrigada por todo apoio, por compreenderem meus sumiços, por tornarem meus dias mais leves e por me permitirem fazer parte de suas vidas! Agradeço também aos colegas de laboratório, pelas trocas e por todo crescimento neste período.

Agradeço a todos os meus professores, desde o início da minha jornada, passando pela graduação, até chegar aqui. Ao relembrar minhas brincadeiras favoritas, sempre envolviam livros, quadros (feitos das tábuas de casa) e canetas permanentes pintadas nestes “quadros” para

alegria da minha mãe. Foram em vocês que me espelhei para escolher ser professora, e é por cada novo mestre, o qual tenho prazer de sempre aprender algo, que alimento este desejo crescente. Em especial, agradeço ao meu professor do ensino médio, João Luiz. Você, por meio de suas aulas, foi um grande incentivador para que eu seguisse meus estudos. Sempre nos trazendo para a realidade e mostrando dois futuros distintos, os quais cabia exclusivamente a nós escolher qual seguir. Dedico minha formação até aqui a você.

Ao meu grande mestre da graduação, mestrado e pai acadêmico, Alessandro Haupenthal, dedico não apenas este trabalho, mas meu interesse constante pela ciência e pelo conhecimento. Agradeço por ter me escolhido lá em 2016 e por de lá para cá me ensinar tantas coisas que extrapolam o saber científico e abrangem meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por me mostrar que entre 8 e 80 temos 72 oportunidades que também precisam ser analisadas, e que a escolha, bom, esta DEPENDE (Como ouvi essa palavra nestes 4 anos de convívio rrsr). Obrigada por todas as oportunidades, por confiar na minha capacidade, às vezes, mais do que eu. Obrigada aceitar minhas limitações e explorar meus pontos fortes. É um desafio encontrar palavras para expressar minha admiração e gratidão pelo senhor. Meu pai me alfabetizou, e você, papai acadêmico, me alfabetizou cientificamente. Gratidão por tudo, levarei seus ensinamentos por onde eu for!

A você, Dani Haupenthal, minha mais profunda admiração, carinho e gratidão! Obrigada por sua paciência em responder inúmeros áudios, mensagens e e-mails. Por sua disponibilidade em ajudar, acalmar e estar presente. Se hoje apresento este trabalho, em parte é porque você, Dani, idealizou e esteve comigo em todos os momentos.

Minha eterna gratidão ao Laboratório de Fisiopatologia Experimental da UNESC, em especial ao professor Dr. Paulo César Lock Silveira e seus alunos. Obrigada por me acolherem de braços abertos, sanarem minhas dúvidas e aceitarem a pouca experiência em pesquisa pré-clínica. Este trabalho só foi possível graças a vocês. Muito obrigada!

Gostaria de deixar registrado meu agradecimento ao professor Dr. Rafael C. Dutra, por ter me apresentado o mundo dos estudos pré-clínicos e por me ajudar a vencer o medo de realizar pesquisas em animais. Com certeza me senti confiante e capaz para fazer este trabalho graças às trocas de experiências que pude compartilhar em seu laboratório.

Obrigada a Reabilitar Núcleo de Fisioterapia, meu primeiro local de trabalho como fisioterapeuta. Obrigada Áudria e Isabel pela oportunidade de poder adquirir experiência no ambiente hospitalar e por confiarem no meu trabalho. Obrigada pelas trocas entre os colegas, amizades construídas e por aceitarem e compreenderem minha ausência para que pudesse concluir este trabalho!

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de poder realizar minha graduação e agora mestrado pela mesma. Ao Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina UNIEDU/Pós Graduação, pela bolsa de mestrado para que eu pudesse realizar esta pesquisa. Agradeço também à banca, por aceitarem o convite e contribuírem com este trabalho!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo Da Vinci

RESUMO

Introdução: Após lesão muscular, o tecido inicia uma série de eventos inflamatórios e miogênicos na tentativa de restabelecer a homeostase. A exacerbação do processo inflamatório pode aumentar os danos teciduais e prolongar o tempo de reparo tecidual. A crioterapia é um recurso utilizado no tratamento de lesões musculares com objetivo de prevenir danos secundários decorrentes da exacerbação da resposta inflamatória. Porém, não há consenso da frequência ideal de aplicação capaz de promover os efeitos propostos sem retardar o reparo tecidual. **Objetivo:** Verificar qual frequência de crioterapia antes de 24 horas após lesão muscular por contusão é mais eficaz no controle do processo inflamatório e estresse oxidativo sem causar prejuízo ao reparo tecidual. **Método:** Para este estudo experimental foram utilizados 100 ratos Wistar divididos em cinco grupos (n=20 cada grupo): Sham (S); Lesão muscular por contusão (LM), LM com uma aplicação de Crioterapia (LM + C1), LM com duas aplicações de Crioterapia (LM + C2) e LM com três aplicações de Crioterapia (LM + C3). Os animais foram anestesiados e submetidos à um protocolo de lesão traumática por contusão no músculo gastrocnêmio direito e imediatamente após o trauma, todos os animais dos grupos intervenção receberam o tratamento com gelo triturado, durante 20 minutos. As aplicações dos grupos LMC2 e LMC3 foram realizadas com intervalo de três horas. Após procedimentos, metade dos animais de cada grupo (N= 10) foram submetidos à eutanásia por decapitação no 2º dia e os demais passaram pelo mesmo procedimento no 7º dia após a lesão. Foram realizadas análises histológicas do tecido muscular, avaliação das proteínas TNF- α , IL1- β , IL-6 (pró-inflamatórias) e IL-10 (anti-inflamatória), e dos marcadores de estresse oxidativo: DCF, NO, Carbonil, Sulfidril, SOD e GSH. Os dados foram expressos em média e desvio padrão e analisados pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. Com nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** As citocinas pró-inflamatórias no 2º e 7º dia após a lesão aumentaram suas expressões após lesão muscular e a aplicação da crioterapia fez esses valores ficarem mais próximos aos valores do grupo Sham. O estresse oxidativo foi controlado positivamente no grupo LM + C3, por meio da redução dos níveis de NO e DCF, controle nos níveis de Sulfidril e Carbonil, com valores próximos ao do grupo Sham bem como os valores de SOD e GSH. Pela análise histológica, LM + C3 reduziu o número de infiltrados leucocitários, não influenciando no nível de colágeno cicatricial. **Conclusão:** A crioterapia apresentou efeitos positivos nos marcadores de reparo tecidual analisados ao ser aplicada antes de 24 h após lesão. Estes resultados puderam ser observados no grupo que recebeu três aplicações de crioterapia.

Palavras-chave: Lesão muscular. Terapia por frio. Inflamação. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Inflammatory and myogenic response occurs as a consequence of muscle injury in an attempt to restore homeostasis. The exacerbation of inflammatory response can increase tissue damage and prolong the time needed for soft tissue repair. Cryotherapy is a technic used on muscle injury treatment in order to prevent secondary injury resulting from the exacerbation of inflammatory response. However, there is no consensus regarding the ideal frequency of application that would achieve cryotherapy effects without delaying soft tissue repair. Cryotherapy has applications in both control and prevention of secondary injuries. However, there is no consensus regarding the ideal frequency of application that would achieve cryotherapy effects without delaying soft tissue repair. **Objective:** To analyze which frequency of cryotherapy application within the first 24 hours after muscle contusion injury is the most effective in controlling inflammatory response and oxidative stress with less influence on soft tissue repair. **Methods:** In this experimental study, 100 Wistar rats were allocated to the following groups (n=20 per group): Sham (S); muscle contusion injury (LM), LM with one application of cryotherapy (LM + C1), LM with two applications of cryotherapy (LM + C2) and LM with three applications of cryotherapy (LM + C3). The animals were anesthetized and the right gastrocnemius muscle was bruised to induce traumatic muscle contusion injury. Immediately after muscle contusion, crushed ice was applied in the intervention groups for 20 minutes. Cryotherapy applications for LM + C2 and LM + C3 groups were performed with a three-hour interval. Ten animals of each group were euthanized by decapitation at day 2 after muscle contusion, whereas the remaining animals at day 7. Histological analysis of muscle tissue, evaluation of TNF- α , IL1- β , IL-6 (pro-inflammatory) and IL-10 (anti-inflammatory) proteins, and oxidative stress markers: DCF, NO, Carbonyl, Sulfidrila, SOD and GSH were performed. The data is expressed as mean and standard deviation, and it was analyzed using analysis of variance (ANOVA), and Bonferroni's post hoc tests. The significance level set at 0.05. **Results:** Pro-inflammatory cytokines expression increased in both day 2 and 7 after muscle contusion, and the application of cryotherapy reduce these values to an extent that values similar to those of the S group were found. The reduction of NO and DCF levels, as much as of SOD and GSH values associate to the control of Sulfidrila and Carbonyl levels (values similar to S group) suggests that oxidative stress was controlled in the LM + C3 group. The histological analysis indicate that LM + C3 reduced the number of leukocyte infiltrates, without influencing collagen levels. **Conclusion:** Three applications of cryotherapy within the first 24 hours after muscle contusion injury had positive effects on the markers of soft tissue repair.

Keywords: Muscle injury. Cold therapy. Inflammation. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prensa utilizada para lesão por contusão.	20
Figura 2 – Representação esquemática do experimento com linha do tempo para o período de tratamento imediatamente após lesão e finalização do experimento com eutanásia.	22
Figura 3 - Comportamento das citocinas TNF- α , IL-6, analisadas pela ANOVA Two - Way e IL-1 β , IL-10 analisadas pela ANOVA One-Way.	29
Figura 4 - Níveis de NO (2A) entre os grupos analisado pela ANOVA One-Way e DCF (2B) entre os grupos e nos dois recortes de tempo analisado pela ANOVA Two-Way.....	32
Figura 5 - Análise dos níveis dos marcadores de dano oxidativo Sulfidril (A) e Carbonil (B) entre os grupos, 2 e 7 dias após intervenção.	34
Figura 6 - Análise da atividade da enzima antioxidante SOD (A) e da atividade do antioxidante não enzimático GSH (B) entre os grupos, 2 e 7 dias após intervenção.	36
Figura 7 - Imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio.....	37
Figura 8 - Análise da concentração de infiltrados (A), angiogênese (B) e Fibroplasia (C) nos grupos no tempo de 2 e 7 dias após intervenção.	39
Figura 9 - Análise da formação de colágeno nos diferentes grupos, verificado nos dias 2 e 7 após intervenções.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da comparação aos pares na histologia analisada pela ANOVA Two-Way com Post hoc de Bonferroni, expressos em média, desvio padrão e intervalo de confiança de todos os grupos 2 e 7 dias após intervenção.....	52
Tabela 2 - Resultado da análise bioquímica das citocinas anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) e pró inflamatórias (IL-10) analisadas pela ANOVA Two-Way com Post hoc de Bonferroni, expressos em média, desvio padrão e intervalo de confiança de todos os grupos 2 e 7 dias após intervenções.	53
Tabela 3 - Resultado da análise bioquímica dos marcadores oxidantes (NO, DCF), de dano oxidativo (Sulfidril e Carbonil) e antioxidantes (SOD e GSH) avaliados pela ANOVA Two-Way.	54
Tabela 4 - Resultados da análise bioquímica e histológica das variáveis que não apresentaram interação na análise ANOVA Two-Way e foram analisadas pela ANOVA One-way com Post hoc de Bonferroni.....	56
Tabela 5 - Temperatura superficial da pele antes e após aplicação da crioterapia.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA - Comissão de Ética para Uso de Animais.

CIDEP/RS - Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa.

EROS – Espécies reativas de oxigênio.

GSH - Glutathione

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio.

IL-1 β - Interleucina 1 β .

IL-10 - Interleucina 10.

IL-6 - Interleucina 6.

iNOS - Óxido nítrico sintase indutível.

LFB - luxolfast blue

LM - Lesão Muscular

LM + C1 - Lesão muscular e uma aplicação de crioterapia

LM + C2 - Lesão muscular e duas aplicações de crioterapia

LM + C3 - Lesão muscular e três aplicações de crioterapia

M1 - Macrófagos tipo 1.

M2 - Macrófagos tipo 2.

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B, do inglês Factor Nuclear Kappa B.

NO - Óxido nítrico.

ONOO - Peroxinitrito.

SOD - Superóxido dismutase.

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral.

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	MÉTODO	19
2.1	TIPO DE ESTUDO E VÁRIAS ANALISADAS	19
2.2	PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	19
2.3	ANIMAIS	19
2.4	MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA	20
2.5	PROTOCOLO DE CRIOTERAPIA.....	21
2.6	HISTOLOGIA	22
2.7	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	23
2.7.1	Determinação do conteúdo de citocinas.....	23
2.7.2	Espécies Reativas- Oxidantes.....	23
2.7.3	Marcadores de danos oxidativos	23
2.7.4	Defesas antioxidantes	24
2.8	PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS	24
3	RESULTADO	26
3.1	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	26
3.1.1	Citocinas	26
3.1.2	Produção de oxidantes.....	31
3.1.3	Dano Oxidativo	33
3.1.4	Sistema Antioxidante.....	35
3.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA	37
3.2.1	Infiltrados	37
3.2.2	Angiogênese	38
3.2.3	Fibroplasia.....	38
3.2.4	Colagênese	40
4	DISCUSSÃO	41

5	CONCLUSÃO.....	46
6	REFERENCIAS.....	47
7	APENDICES	52
	APENDICE A	52
	APENDICE B.....	56
8	ANEXOS.....	58
	CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS	58

1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um tecido suscetível a lesões (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004) e uma das lesões musculares mais comuns é a lesão por contusão (SMITH et al., 2008; PUNTEL et al., 2010; JÄRVINEN; JÄRVINEN; KALIMO, 2013). Comumente ocorre advinda de uma força repentina unidirecional de compressão como um golpe direto (JÄRVINEN; JÄRVINEN; KALIMO, 2013). O retorno à atividade funcional, bem como a homeostase muscular, advém da notável capacidade de regeneração mesmo após graves danos musculares (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; TIDBALL; VILLALTA, 2010). Para estudar o processo de regeneração muscular é preciso compreender os mecanismos miogênicos e mieloides envolvidos no processo de reparo tecidual. Com esse intuito, é necessário desenvolver modelos animais de lesão muscular de maneira controlada e reprodutível (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). Lesões musculares agudas oferecem um sistema atraente para explorar essas interações, pois o início do dano tecidual é bem definido e os ciclos de inflamação e regeneração são previsíveis (TIDBALL; VILLALTA, 2010).

Nos mais diversos modelos de danos, os processos regenerativos parecem semelhantes (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). A resposta inflamatória durante os estágios iniciais da regeneração muscular é acoplada temporal e espacialmente aos estágios iniciais da miogênese, quando as células satélites são ativadas primeiro e começam a proliferar e se diferenciar. Esta interação complexa e coordenada entre o músculo e o sistema imunológico, é que determina o sucesso ou o fracasso da regeneração tecidual (TIDBALL, 2017). Embora a fase degenerativa e a fase regenerativa do processo de reparo muscular sejam similares entre os diferentes tipos de músculos e lesões, a cinética e a amplitude de cada fase podem variar dependendo da extensão da lesão, do músculo lesionado ou do modelo animal (GROUNDS, 1992; PAVLATH et al., 1998). Um modelo de lesão muscular válido e amplamente utilizado é o de contusão induzido em animais (CRISCO et al., 1994; RIZZI et al., 2006; SILVEIRA et al., 2016a).

Concomitante com a lesão o tecido inicia uma série de eventos inflamatórios e miogênicos na tentativa de restabelecer a homeostase (YANG, HU 2018). O processo de regeneração muscular é influenciado de forma direta e indireta através de expressões gênicas pelas células inflamatórias e por agentes externos como antiinflamatórios e recursos terapêuticos, por exemplo (URSO, 2013; SILVEIRA et al., 2016b, VIEIRA RAMOS et al., 2016; DOS SANTOS HAUPENTHAL et al., 2020). Independente da origem, o dano muscular inicia uma resposta inflamatória estereotipada na qual o número de leucócitos intramusculares

pode aumentar rapidamente. O sucesso da regeneração muscular está atribuído em grande parte às células miogênicas, também chamadas de células satélites (YANG; HU, 2018). As células satélites ativadas devem ter a capacidade de restaurar a população de reserva das células satélites após lesões para manter o potencial regenerativo do músculo. No entanto, a presença de células satélites sozinha é insuficiente para a regeneração muscular (BENCZE et al., 2012).

Após lesão muscular, ocorre ativação de neutrófilos quiescentes no tecido os quais liberam citocinas pró inflamatórias para promover sinalização e migração celular ao tecido lesionado. Após o início da invasão de neutrófilos, estes induzem a infiltração de macrófagos (YANG, HU 2018). Ao chegarem no tecido, os macrófagos expressam fenótipo M1, os quais têm o objetivo de promover a limpeza tecidual através da fagocitose dos detritos (CHARGE; RUDNICKI, 2004; TIDBALL, 2017). Os neutrófilos atingem números elevados dentro de 1-6 horas e pico de concentração entre 6-24 horas após lesão. Enquanto que os macrófagos M1 atingem concentrações elevadas cerca de 24 horas e continuam aumentando por até 2 dias após a lesão (TIDBALL; VILLALTA, 2010; YANG, HU 2018).

Os macrófagos desempenham papel importante no reparo tecidual (TAKAGI et al., 2011; VIEIRA RAMOS et al., 2016; XIAO; LIU; CHEN, 2016). Estes, durante o processo de regeneração muscular, passam por dois estágios diferentes de ativação e são categorizadas em dois tipos principais: M1 e M2. Os macrófagos M1 são pró-inflamatórios, enquanto os macrófagos M2 são antiinflamatórios (YANG, HU 2018). Uma vez que o macrófago M1 sofre a modificação para o fenótipo M2, se torna o principal responsável por estimular a miogênese e a diferenciação de mioblastos na formação de miotubos (ARNOLD et al., 2007; TAKAGI et al., 2011; BENCZE et al., 2012).

Ao mesmo tempo que o processo inflamatório desempenha importante papel no processo de reparo tecidual, a resposta exacerbada pode aumentar os danos teciduais pelo excesso de infiltrado leucocitário, estresse oxidativo e hipóxia secundária (MERRICK, 2002; SMITH et al., 2008; TIDBALL; VILLALTA, 2010). Na tentativa de evitar este desfecho, recursos capazes de controlar o processo inflamatório e impedir danos secundários ao tecido advindo dessa resposta fisiológica são utilizados (SILVEIRA et al., 2016b, VIEIRA RAMOS et al., 2016). A crioterapia constitui um dos recursos de primeira escolha na fase aguda da lesão muscular (KNIGHT, 1995; SWENSSON et al., 2011), por ser capaz de controlar o processo inflamatório (VIEIRA RAMOS et al., 2016; DOS SANTOS HAUPENTHAL et al., 2020). Desta forma, se mostra eficaz em prevenir a formação de edema, hipóxia secundária, redução da taxa metabólica, formação de ROS e promover efeitos analgésicos no tecido (CURL et al.,

1997; YANAGISAWA et al., 2007; PUNTEL et al., 2011; KUO et al., 2013; VIEIRA RAMOS et al., 2016; DOS SANTOS HAUPENTHAL et al., 2020).

A crioterapia possui capacidade de controlar o processo inflamatório, principalmente, por meio da vasoconstrição, a qual proporciona redução do fluxo sanguíneo e aumento da viscosidade sanguínea contribuindo para diminuição da permeabilidade e diapedese (PUNTEL et al., 2011; KUO et al., 2013). A redução da permeabilidade capilar associada ao estímulo do retorno venoso pela vasoconstrição, são capazes de atenuar as chances de formação de edema no tecido lesionado após aplicação de crioterapia (DEAL et al., 2002; SWENSSON et al., 2011). A prevenção da formação de edema após aplicação de crioterapia contribui para viabilidade dos tecidos próximos à lesão e na redução da dor. A crioterapia contribui para a prevenção da lesão secundária ocasionada por hipóxia pós-traumática, devido a contenção do edema, no qual evita pressão e isquemia dos vasos íntegros e pela redução da taxa metabólica, à qual reduz o consumo de oxigênio e permite que os vasos que se mantiveram íntegro após lesão, supram a necessidade do tecido adjacente (MERRICK et al. 1999; SWENSON et al. 1996). Dentre os principais mecanismos envolvidos na promoção do efeito analgésico após aplicação da crioterapia, temos a prevenção de edema, redução da condução nervosa, de PGE2 e modulação das comportas da dor (STALMAN et al., 2011; PIANA et al., 2018).

Na prática clínica, a crioterapia é comumente aplicada nas primeiras 72 horas, seguindo uma frequência de três aplicações intermitentes por dia (BLEAKLEY et al., 2006; SWENSON; SWARD; KARLSSON, 1996). No entanto, alguns estudos apontam que aplicar a crioterapia por 72 horas pode retardar o processo de reparo tecidual e, conseqüentemente, o retorno às atividades (COLLINS, 2008; TAKAGI et al., 2011). Baseado nisto, Vieira Ramos et al. (2016) estudaram os efeitos da aplicação de crioterapia nas primeiras 48 horas após lesão com frequência de três aplicações por dia. Seus resultados demonstram que o protocolo foi capaz de reduzir o processo inflamatório, sem alterar o processo de reparo tecidual. No entanto, houve diminuição da expressão de macrófagos no tecido. Essa diminuição relatada por Vieira Ramos et al. (2016), pode ser decorrente da redução do processo inflamatório o qual influencia diretamente a proliferação de macrófagos M1 e sucessivamente a expressão de M2 (TAKAGI et al., 2011), o que pode ocasionar atraso no reparo tecidual (XIAO; LIU; CHEN, 2016).

Compreender o processo inflamatório e a influência dos recursos terapêuticos sobre o reparo tecidual é crucial para o sucesso da reabilitação. Como o pico de sinalização da resposta inflamatória ocorre nas primeiras 24 horas, aplicar a crioterapia apenas nesta janela de tempo pode favorecer o controle da resposta inflamatória e danos secundários e com menor chance de

influenciar o tempo de reparo tecidual. No entanto, tão importante quanto saber por quantos dias realizar a aplicação, é saber quantas aplicações são necessárias para atingir os efeitos desejados sem prolongar o reparo tecidual e de maneira que otimize o processo de reabilitação. A partir desse contexto, o objetivo desse estudo foi verificar qual frequência de crioterapia antes de 24 horas após lesão muscular por contusão é mais eficaz no controle do processo inflamatório. Baseado nisso, as questões que queremos responder são: I) se a crioterapia apenas nas primeiras 24 horas após a lesão por contusão será suficiente para controlar a resposta à lesão sem atrasar o reparo e II) qual a frequência de aplicação que será mais eficaz para o controle da resposta e reparo do tecido. Nossa hipótese é de que a crioterapia será capaz de controlar o processo inflamatório e sistema antioxidante, sem causar atraso no reparo tecidual. Ainda, que a partir de duas aplicações será possível observar tais benefícios.

2 MÉTODO

2.1 TIPO DE ESTUDO E VÁRIAS ANALISADAS

Trata-se de um estudo experimental em animal. As variáveis independentes analisadas foram as diferentes frequências de aplicação da crioterapia, nas primeiras 24 horas após lesão muscular por contusão e a dependente o processo inflamatório e estresse oxidativo por meio das variáveis escolhidas para serem analisadas neste trabalho.

2.2 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC (ANEXO I), para avaliação e aprovação com todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7).

2.3 ANIMAIS

Foram utilizados 100 ratos Wistar (2 meses pesando entre 250-300g), provindos da colônia de reprodução do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense -UNESC. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (comprimento 30 cm x Largura 20 cm x altura 13 cm), colocadas sobre estantes e sob os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente foi controlada entre $20 \pm 2^\circ \text{C}$, ciclo claro-escuro 12/12 h com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocada em mamadeiras para roedores e ofertada ad libitum. Diariamente os animais foram retirados do biotério e levados à uma sala de manipulação onde foram realizados os procedimentos, por pessoas treinadas em manusear ratos Wistar.

Os animais foram divididos em 5 grupos:

Grupo 1 – Sham

Grupo 2 – Lesão Muscular (LM)

Grupo 3 – LM + Crioterapia 1x (LM + C1)

Grupo 4 – LM + Crioterapia 2x (LM + C2)

Grupo 5 – LM + Crioterapia 3x (LM + C3)

Cada grupo teve vinte animais devido às análises histológicas, bioquímicas e moleculares que foram feitas no segundo e sétimo dia após modelo de lesão. Para a realização das análises bioquímicas (parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo) foram utilizados 16 animais, destes 8 destinados às análises realizadas em 48h e o restante para as análises realizadas no prazo de 7 dias após a lesão. Quatro (4) animais de cada grupo foram utilizados para as análises histológicas.

2.4 MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA

O modelo de trauma muscular deste estudo foi desenvolvido de acordo com o de Rizzi et al. (2006), que é um modelo comumente utilizado no Laboratório de Fisiopatologia experimental para verificar os efeitos do uso de recursos terapêuticos sob parâmetros da lesão muscular, como estresse oxidativo, processo inflamatório e reparo tecidual (SILVEIRA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2016b). Os animais foram anestesiados com Isoflurano a 4%. A lesão no gastrocnêmio foi realizada por impacto proveniente de trauma direto em prensa desenvolvida pelo Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brasil) conforme Figura 1. A lesão foi produzida por deslocamento de uma massa metálica (0,459 kg) através de uma guia com 18 cm de altura. O impacto produz uma energia cinética de 0,811 J, conforme especificações do equipamento.

Figura 1 - Prensa utilizada para lesão por contusão.

(A) Prensa Lesionadora

(B) Prensa acionada

(C) Queda/Impacto



Fonte: Imagem cedida pelo Laboratório de Fisiopatologia Experimental - UNESC

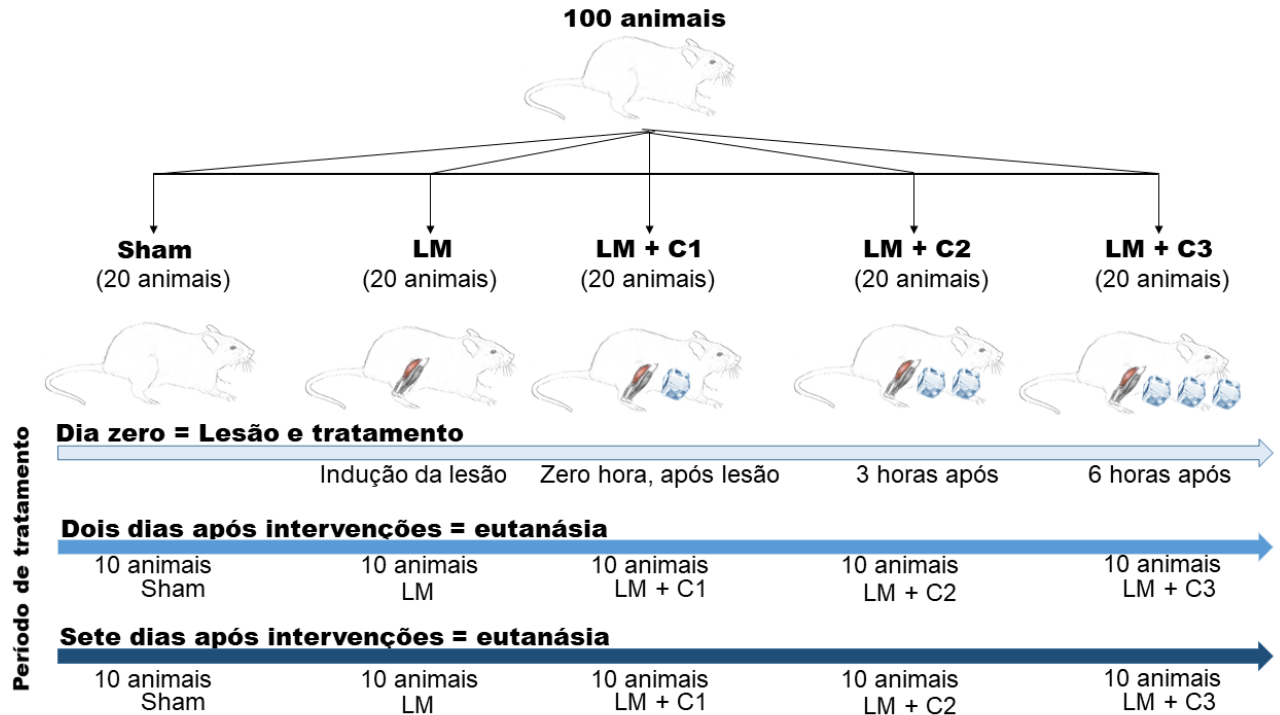
2.5 PROTOCOLO DE CRIOTERAPIA

Todo o processo de lesão e aplicação da crioterapia ocorreu no dia zero (0) após lesão. Nos grupos lesão submetidos ao tratamento, denominado Lesão Muscular e Crioterapia (LMC), a primeira sessão de crioterapia foi realizada imediatamente após o trauma, sendo que nos grupos que receberam mais de uma aplicação de crioterapia, estes respeitaram o intervalo de tempo pré-estabelecido de 3 h entre as aplicações. Denominou-se LM + C1, o grupo que recebeu uma aplicação de crioterapia; LM + C2 o grupo recebeu duas aplicações de crioterapia e LM + C3 o grupo recebeu três aplicações de crioterapia.

O tempo de aplicação da crioterapia foi selecionado a partir de estudo prévio realizado pelo laboratório, no qual utilizou o tempo de aplicação de 20 minutos (DOS SANTOS HAUPENTHAL et al., 2020). Este tempo já é estabelecido como capaz de atingir a temperatura necessária para os efeitos fisiológicos advindos da técnica ($<13.6^{\circ}\text{C}$ a 10°C) (BUGAJ, 1975; CHESTERTON et al., 2002; KANLAYANAPHOTPORN & JANWANTANAKUL, 2005; KENNET et al., 2007). Além disso, permite menor tempo de sedação dos animais a fim de evitar perdas amostrais. O intervalo de 3h entre as aplicações foi selecionado visando reduzir a chance de lesão por hipóxia decorrente da hipotermia (KHOSHNEVIS et al., 2015).

Os animais foram mantidos sob anestesia e posicionados com o membro inferior posterior direito em extensão, de forma a expor a área lesionada e favorecer o resfriamento no local desejado. As aplicações de crioterapia foram realizadas por meio de sacos plásticos contendo gelo triturado. A temperatura da pele dos animais foi aferida com termômetro infravermelho, modelo MT-350 da marca Minipa do Brasil LTDA, antes e imediatamente após a aplicação da terapia. Metade dos animais de cada grupo (N=10) foram submetidos à eutanásia por decapitação no 2º dia após a lesão e os demais (N=10) no 7º dia (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática do experimento com linha do tempo para o período de tratamento imediatamente após lesão e finalização do experimento com eutanásia.



Fonte: Autora.

2.6 HISTOLOGIA

No segundo e sétimo dia após induzir o modelo de trauma muscular, 4 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia e o músculo gastrocnêmico perfundido com solução de Paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão Fosfato 0,1 M (pH 7,4). A região lesionada foi removida e pós-fixadas por 24 h na mesma solução (PFA 4%), e em seguida embebidas em parafina após desidratação e diafanização e seccionadas em cortes de 5 μ m de espessura. As análises histológicas da infiltração leucocitária, fibroblastos, vasos sanguíneos e depósito de colágeno foram realizadas com hematoxilina-eosina e Ponceau de xilidina, respectivamente. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, sendo que quatro campos oculares por corte (4 animais/grupo) foram capturados. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear das células inflamatórias (H&E). Os dados foram expressos como densidade óptica (DO) (CHALK et al., 1994).

2.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises bioquímicas e histológicas foram realizadas e cedidas pelo grupo coordenado pelo professor Paulo César Lock Silveira, no Laboratório de Fisiopatologia Experimental – UNESC.

2.7.1 Determinação do conteúdo de citocinas

As amostras foram processadas e após foi sensibilizada a placa para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem das citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) foi utilizado o método enzyme-linked immunosorbent assay (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA).

2.7.2 Espécies Reativas- Oxidantes

Diclorofluoresceína DCFH-DA: A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'diclorofluoresceína (DCFHDA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'diclorodihidrofluoresceína (DCFHDA) por ROS de acordo com o método descrito anteriormente por Lebel et al., (1992), com algumas modificações.

Indicador da Formação de Oxido Nítrico (NO): A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de N1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância medida a 540 nm. O conteúdo de nitrito foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram calculados em μ mol Nitrito/mg proteína (CHAE, 2004).

2.7.3 Marcadores de danos oxidativos

Carbonilação de Proteínas: A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370 nm (LEVINE et al., 1990). Os

resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹. cm⁻¹.

Conteúdo de sulfidril: Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor ácido ditionitrobenzóico (DTNB), que reduziu os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB), que foi mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412 nm (AKSENOV E MARKESBERY, 2001).

2.7.4 Defesas antioxidantes

Superóxido Dismutase (SOD): Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese, (1987). As amostras de músculo foram homogeneizadas em tampão de glicina. Volumes de 5, 10 e 15 ul foram retirados da mesma, e a estes foram adicionados 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), 175185 mL de tampão de glicina (0,75g em 200 ml de água destilada a 32° C, pH 10,2) e 5 ul de adrenalina (60 mM em água destilada +15 ml/ml de HCl fumegante). As leituras foram realizadas por 180 s em intervalos de 10 s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Glutationa (GSH): Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf, (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurada em homogenato de músculo após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µM DTNB. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

2.8 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

Para a caracterização dos dados foi utilizada a estatística descritiva, com a valores de média (\bar{X}) e desvio padrão (s) das variáveis coletadas. Utilizou-se ANOVA *two-way* na comparação das variáveis entre os grupos e os dias de eutanásia. Não havendo interação significativa, isto indica que o efeito do tratamento é o mesmo independente do dia. Nesse caso, foi realizada uma comparação geral por meio da soma das médias dos dois dias para cada grupo com a retirada do fator tempo da análise. Assim, quando não houve interação, o comportamento

das variáveis entre os grupos foram analisadas por meio da ANOVA *One-Way* (BATE; CLARK, 2014). Na comparação aos pares, foi utilizado post hoc de Bonferroni. O nível de confiança adotado para todos os testes foi de 95 % ($p < 0.05$).

3 RESULTADO

Neste capítulo, serão apresentados os resultados dos parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e histológicos analisados neste estudo. No APENDICE A, encontram-se os dados descritos em média, desvio padrão e intervalo de confiança de todas as análises feitas pelo teste estatístico ANOVA *Two-Way* seguido do valor de p na comparação entre os grupos analisados. Quando não ocorreu interação, os dados foram agrupados e analisados pelo teste estatístico ANOVA *One-Way* (APENDICE B). Ambas análises foram seguidas do post hoc de Bonferroni.

Como variável controle, a temperatura superficial da pele foi aferida antes e após aplicar as diferentes frequências de crioterapia. Conforme valores demonstrados na Tabela 5 do APENDICE A os quais foram analisados pela ANOVA *One-Way*, não houve diferença entre os grupos, nos valores da temperatura superficial da pele antes das aplicações ($p=0.40$). O mesmo comportamento pode ser observado após aplicações, nas quais todos os grupos atingiram valores esperados para se ter os efeitos desejados da crioterapia e não apresentaram diferença significativa ($p=0.24$).

3.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.1.1 Citocinas

Para verificar o comportamento inflamatório nos grupos em que foram aplicados a crioterapia em comparação com os grupos Sham e LM, foram avaliadas as citocinas pró inflamatórias TNF- α , IL-1 β , e IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 3).

Pode ser visto na Figura 3 que as citocinas IL1, IL6 e TNF- α no 2º e 7º dia após a lesão aumentaram suas expressões e a aplicação da crioterapia fez esses valores ficarem mais próximos aos valores do grupo Sham. A partir disso, o efeito do tratamento ocorreu para esses três marcadores do processo inflamatório com a aplicação da crioterapia. Houve interação entre tempo e tratamento para TNF- α ($p<0.001$) e IL-6 ($p<0.05$). IL-1 β e IL-10 não apresentaram interação entre tempo e tratamento e foram avaliadas pela ANOVA *One-Way*.

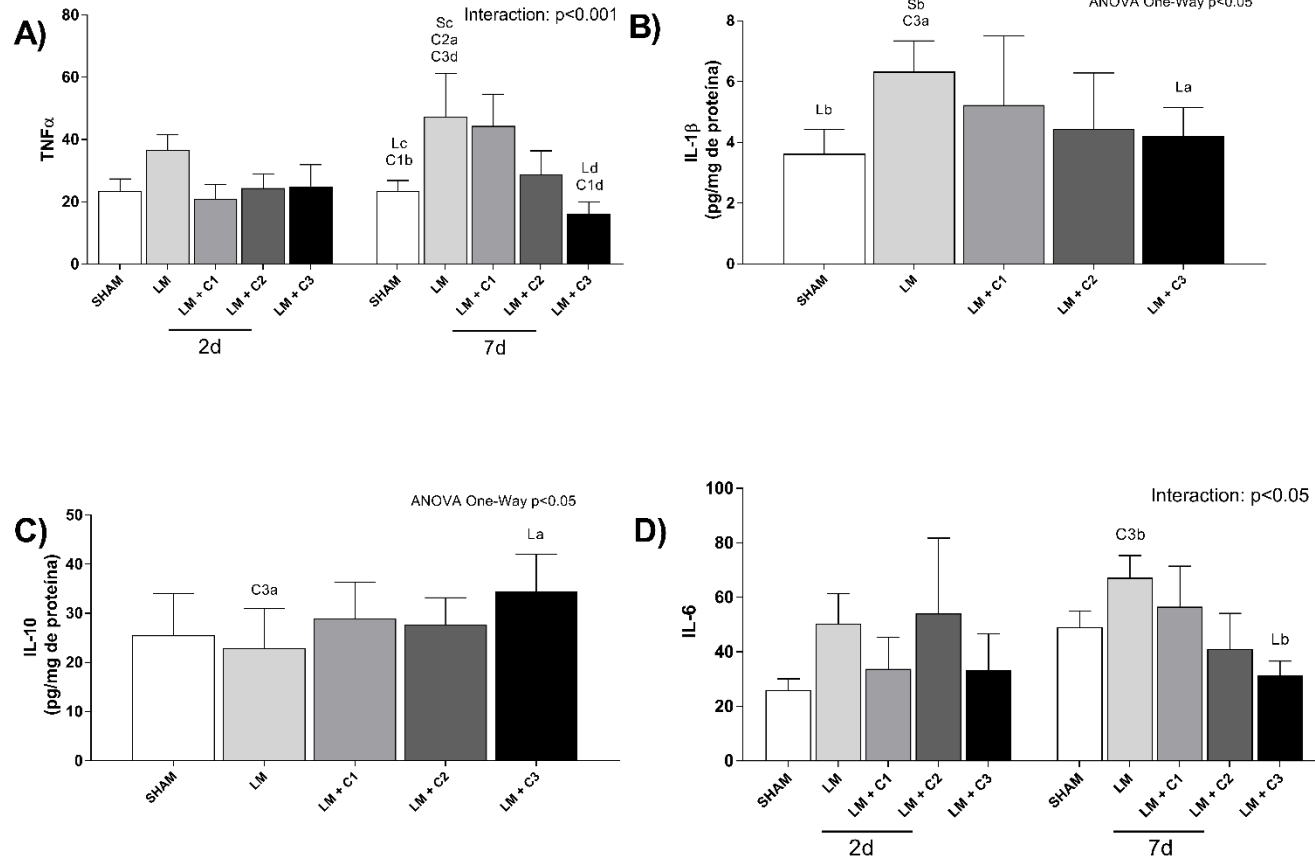
No segundo dia após lesão, os valores de TNF- α e IL-6 não diferiram entre todos os grupos: SHAM, LM, LM+C1, LM + C2, LM + C3. No entanto, 7 dias após intervenções, LM

+ C3 foi o grupo que apresentou menores valores de TNF- α e IL-6, semelhantes ao grupo Sham, e estatisticamente diferentes comparado ao grupo LM ($p < 0.0001$ e $p < 0.01$ respectivamente).

Para a IL-1 β não ocorreu interação entre os grupos, assim o fator tempo foi suprimido da análise (Figura 3B e Apêndice A). O fator tratamento causou alteração na resposta dos valores entre os grupos ($p < 0.01$). O grupo LM teve um aumento na concentração de IL-1 β quando comparado ao Sham ($p < 0.01$). Os grupos que receberam aplicação de crioterapia, apresentaram valores menores de IL-1 β comparado ao grupo LM, no qual o grupo que recebeu 3 aplicações de crioterapia (LM + C3), apresentou diferença estatisticamente significativa nesses valores comparado ao grupo LM ($p < 0.05$).

Para a IL-10 também não ocorreu interação ou efeito do fator tempo (Figura 3D e Apêndice A). O tratamento com crioterapia causou elevação dos níveis de resposta dessa citocina com característica antiinflamatória ($p < 0.05$). A utilização de três aplicações fez com que esse aumento fosse diferente significativamente ($p < 0,05$) do grupo LM.

Figura 3 - Comportamento das citocinas TNF- α , IL-6, analisadas pela ANOVA *Two -Way* e IL-1 β , IL-10 analisadas pela ANOVA *One-Way*.



Legenda: Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM + C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$.

3.1.2 Produção de oxidantes

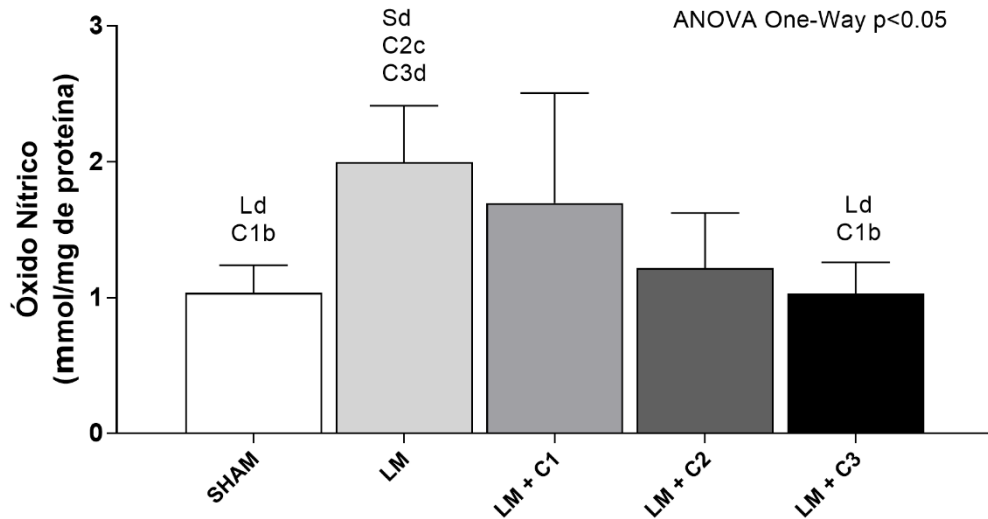
Como marcadores oxidativos foram utilizados o nitrito e DCF. A Figura 4 (A e B) ilustra os resultados do nitrito entre os grupos e DCF entre os grupos no segundo e sétimo dia após intervenções.

Para o nitrito não ocorreu interação entre os grupos, assim o fator tempo também foi suprimido da análise (Figura 4 A e Apêndice B). O fator tratamento causou alteração na resposta dos valores entre os grupos ($p < 0.0001$). O grupo LM teve um aumento na concentração de nitrito quando comparado ao Sham ($p < 0.0001$). Os grupos que receberam mais de duas aplicações de crioterapia, apresentaram valores menores de nitrito comparado ao grupo LM. LM + C3 apresentou valores estatisticamente menores de nitrito comparados ao grupo LM ($p < 0.0001$) e valores semelhantes comparado ao Sham.

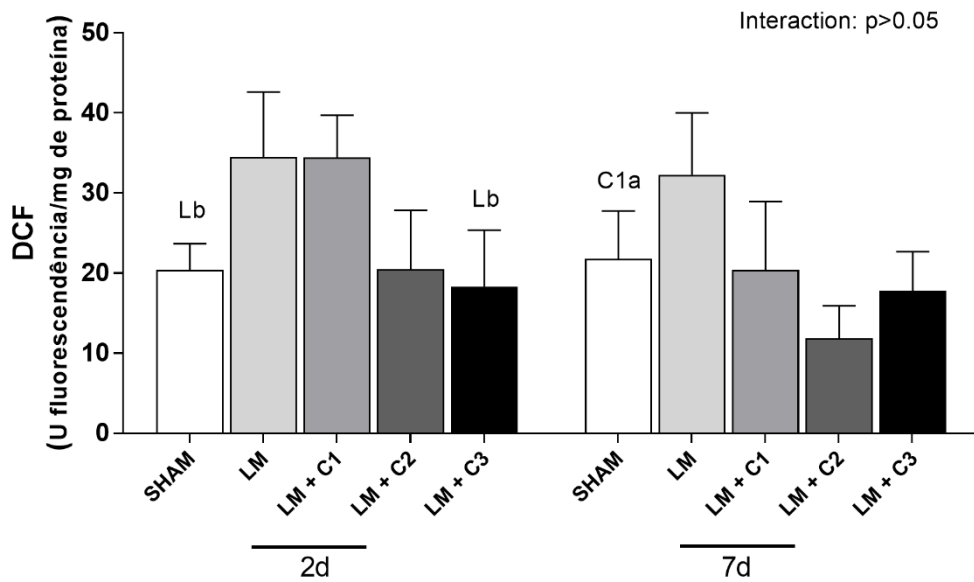
Pode ser visto na Figura 4 B que houve interação entre tempo e tratamento para DCF ($p < 0.05$). Os níveis do DCF no segundo e sétimo dia após a lesão aumentaram suas expressões no grupo LM e os grupos que receberam duas e três aplicações de crioterapia, fizeram esses valores ficarem mais próximos aos valores do grupo Sham. A partir disso, o efeito do tratamento ocorreu para esse marcador oxidativo com a aplicação da crioterapia. LM + C3 apresentou diferença significativa quando comparados ao grupo LM ($p < 0.05$) e ao grupo LM + C1 ($p < 0.05$) no segundo dia após intervenções. Ao observar os níveis de DCF sete dias após intervenção, os grupos que receberam duas ($p < 0.0001$) e três ($p < 0.01$) aplicações de crioterapia apresentaram valores significativamente menores comparado ao grupo LM.

Figura 4 - Níveis de NO (2A) entre os grupos analisado pela ANOVA *One-Way* e DCF (2B) entre os grupos e nos dois recortes de tempo analisado pela ANOVA *Two-Way*.

A)



B)



Legenda Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM +C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$.

3.1.3 Dano Oxidativo

Os níveis de Sulfidrila e Carbonil foram utilizados como marcadores para avaliar o dano oxidativo nos grupos após lesão e aplicação das diferentes frequências de crioterapia conforme demonstrado na Figura 5 A e B.

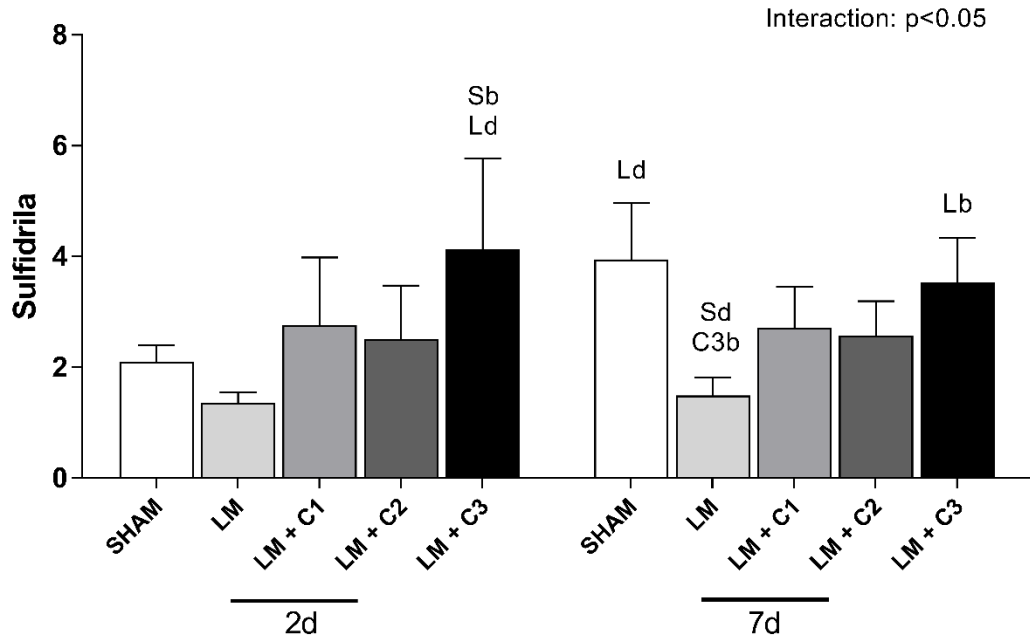
Houve interação significativa entre tempo e tratamento quando avaliado os níveis de Sulfidrila ($p < 0.05$) (Figura 5 A). Todos os grupos que receberam crioterapia, tiveram aumento na concentração de Sulfidrila. Ao avaliar os resultados 2 dias após intervenção, o grupo LM + C3 apresentou aumento significativo comparado ao grupo LM ($p < 0.0001$) e ao Sham ($p < 0.01$). Ao observar os valores 7 dias após intervenção, o grupo Sham teve um aumento nos níveis de Sulfidrila, igualando seus níveis ao do grupo LM + C3. E ambos os grupos, Sham ($p < 0.001$) e LM + C3 ($p < 0.01$) apresentaram diferença estaticamente significativa comparados com o grupo LM.

Os níveis de Carbonil (Figura 5 B), apresentaram interação significativa entre tempo e tratamento ($p < 0.001$). Os níveis de Carbonil no segundo e sétimo dia após a lesão aumentaram suas expressões no grupo LM e os grupos que receberam crioterapia tiveram níveis menores de Carbonil, com valores mais próximos aos valores do grupo Sham. A partir disso, o efeito do tratamento ocorreu para esse marcador de dano oxidativo com a aplicação da crioterapia.

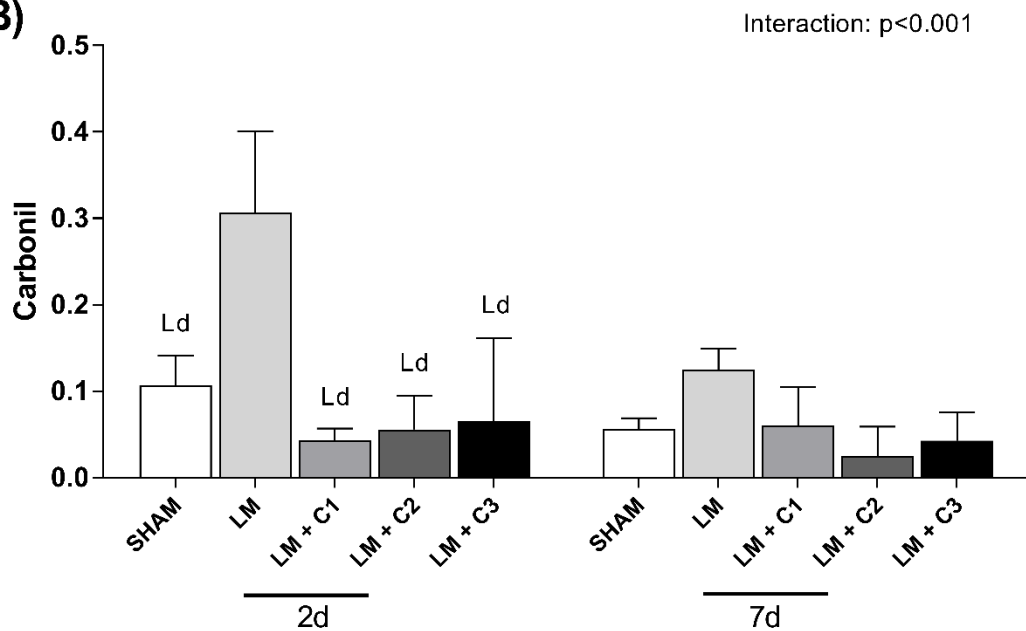
Ao avaliar os níveis de Carbonil no segundo dia, todos os grupos que receberam crioterapia apresentaram valores estaticamente menores comparado ao grupo LM ($p < 0.0001$) e tiveram valores semelhantes ao grupo Sham.

Figura 5 - Análise dos níveis dos marcadores de dano oxidativo Sulfidrila (A) e Carbonil (B) entre os grupos, 2 e 7 dias após intervenção.

A)



B)



Legenda: Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM + C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$.

3.1.4 Sistema Antioxidante

O sistema antioxidante pode atuar por duas vias independentes: Enzimática e não enzimática. A via enzimática foi avaliada por meio da enzima antioxidante SOD, enquanto a via não enzimática foi avaliada pelos níveis de GSH. Os resultados estão expressos na Figura 6 A e B.

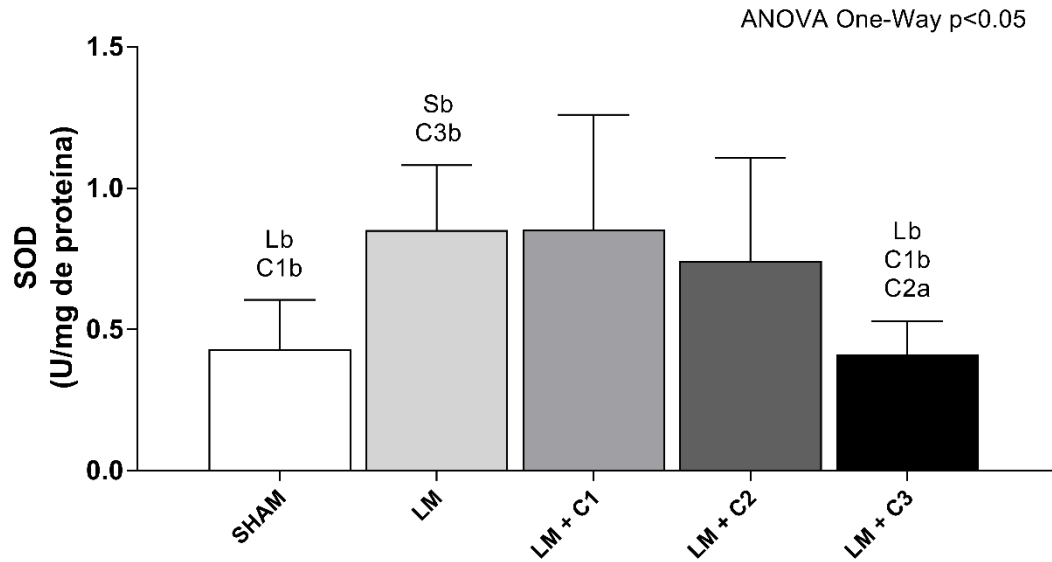
Para a SOD não ocorreu interação e como nos demais, o fator tempo também foi suprimido da análise (Figura 6 A e Apêndice B). O fator tratamento causou alteração na resposta dos valores entre os grupos ($p < 0.0001$). Como esperado a resposta da LM foi aumentar os níveis de SOD em relação ao Sham ($p < 0.01$). O tratamento foi capaz de inverter a resposta a lesão e com três aplicações trazer os níveis de SOD aos valores do Sham. LM + C3 teve valores semelhantes ao grupo Sham, no entanto os demais grupos que receberam crioterapia apresentaram aumento nos níveis da SOD com valores semelhantes ao grupo submetido apenas a lesão muscular.

Para GSH, houve interação significativa entre tempo e tratamento ($p < 0.01$) (Figura WB). Na comparação geral dos grupos, os grupos que receberam duas e três aplicações de crioterapia tiveram no segundo dia, valores maiores de GSH. Ainda, o grupo LM + C3 apresentou valores estatisticamente significativos de GSH comparado ao grupo LM ($p < 0.05$).

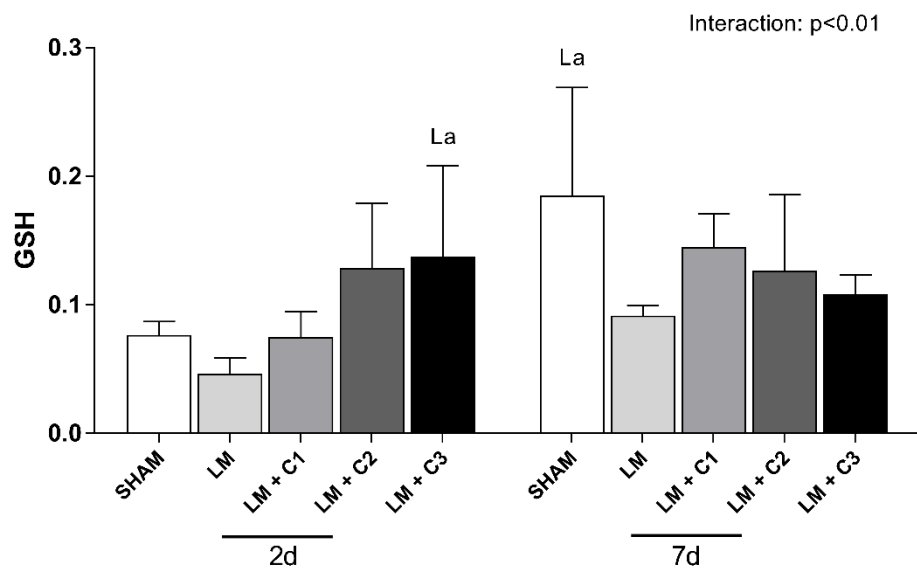
Já ao observar o comportamento dos grupos no sétimo dia, os grupos LM + C2 e LM + C3 que haviam tido valores maiores de GSH no segundo dia, tiveram valores menores comparados aos demais grupos. O grupo Sham apresentou aumento significativo comparado ao grupo LM ($p < 0.05$) e seus valores foram semelhantes aos dos grupos LM + C2 e LM + C3.

Figura 6 - Análise da atividade da enzima antioxidante SOD (A) e da atividade do antioxidante não enzimático GSH (B) entre os grupos, 2 e 7 dias após intervenção.

A)



B)

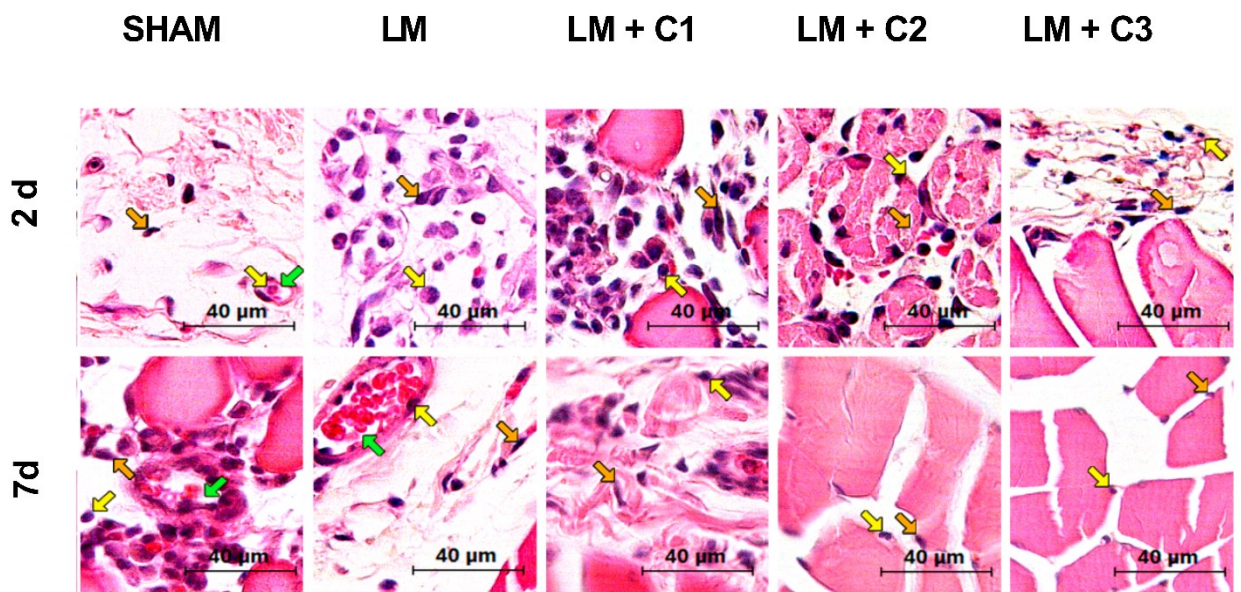


Legenda: Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM + C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$.

3.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na Figura 7, estão as imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio de animais dos grupos: sem lesão (Sham), com lesão muscular traumática (LM) e submetidos a um protocolo de lesão muscular traumática e tratados com três diferentes frequências de crioterapia após lesão (LM+C1, LM+C2, LM+C3). Por meio das imagens histológicas (Figura 7) foram feitas quantificações da média do número de leucócitos (TA), angiogênese (TB) e da média de número de fibroblastos (TC) avaliados dois e sete dias após intervenções.

Figura 7 - Imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio.



Legenda: Imagens representativas de cortes histológicos do musculo gastrocnêmio avaliando o efeito do tratamento com crioterapia no número de infiltrado inflamatório, representado nas setas amarelas , número de fibroblastos, representado nas setas laranjas e angiogênese nas setas verdes.

3.2.1 Infiltrados

Os níveis de infiltrados nos tecidos estão demonstrados na Figura 8 A. A ANOVA *Two-way* demonstrou interação significativa entre tempo e tratamento ($p < 0.001$). Na comparação geral, o grupo LM e LM + C1 e LM + C2 apresentaram aumento expressivo no

número de infiltrados inflamatórios comparado ao grupo Sham e ao grupo LM + C3 padrão que pode ser observado no segundo e sétimo dia após intervenções. Ao analisar o número de infiltrados nos grupos dois dias após intervenções, Sham e LM + C3 foram os grupos que tiveram menores números de infiltrados inflamatório não havendo diferença entre os dois. Ao comparar Sham e LM + C3 com os demais grupos, estes apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado com LM ($p < 0.0001$), LM + C1 ($p < 0.0001$) e LM + C2 ($p < 0.01$). Sete dias após a lesão, o número de infiltrados reduziu em todos os grupos, com valores expressivamente menores quando comparado LM + C3 com os grupos LM + C1 e LM + C2 ($p < 0.05$).

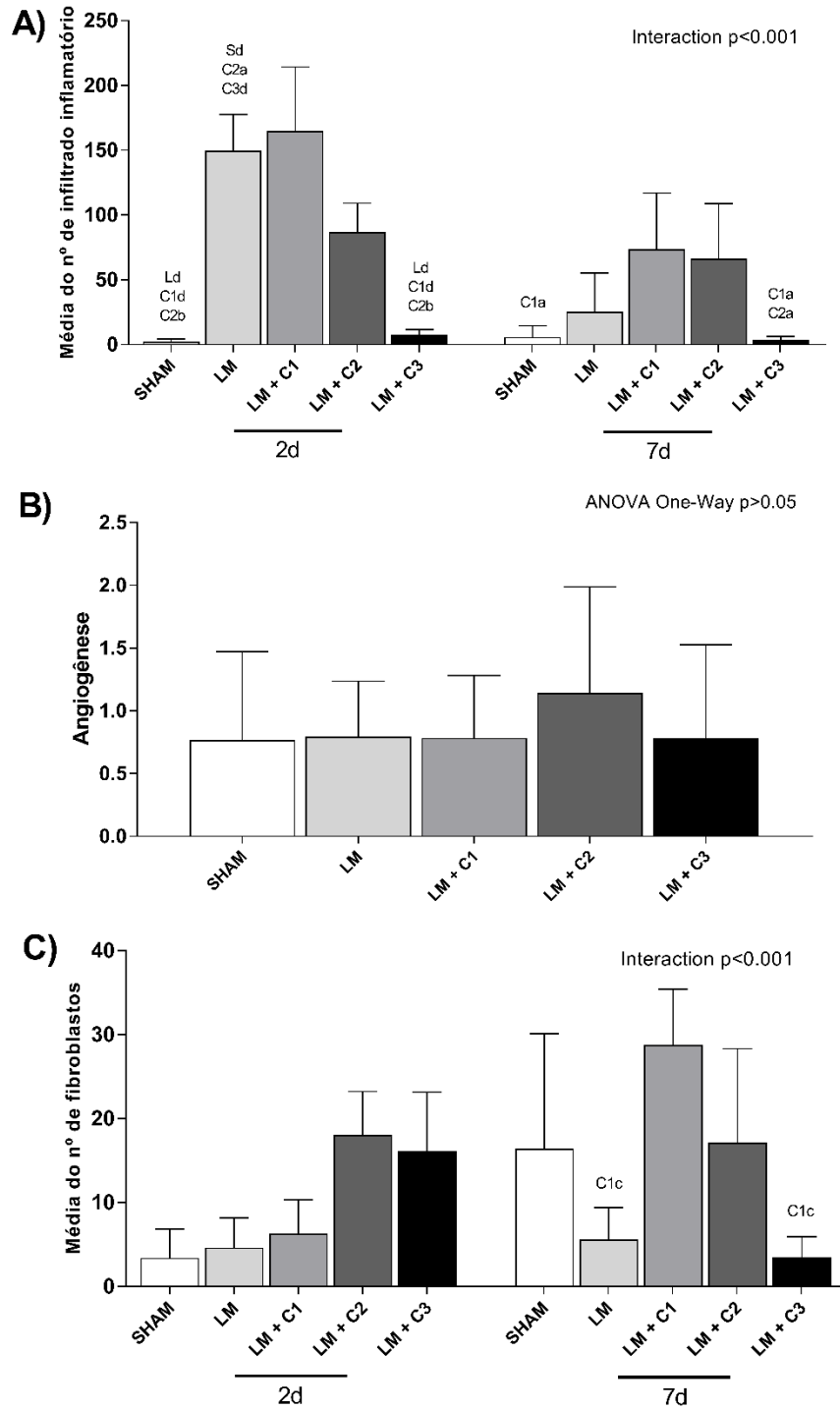
3.2.2 Angiogênese

Após intervenções, o processo de formação de novos vasos foi avaliado em todos os grupos. Não houve interação significativa entre tempo e tratamento. Na análise conjunta também os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa na formação de novos vasos ($p > 0.05$). O fator tratamento não alterou a expressão de formação dos vasos (Figura 8 B).

3.2.3 Fibroplasia

Ocorreu interação para a análise da média de fibroblastos ($p < 0.01$) (Figura 8 C). Dois dias após lesão e aplicação da crioterapia, todos os grupos apresentaram valores semelhantes de fibroblastos no tecido. No entanto, 7 dias após intervenções, o grupo LM + C1 apresentou atividade de fibroplasia maior comparado aos demais grupos, com diferença estatística significativa em relação aos grupos LM e LM + C3 ($p < 0.001$).

Figura 8 - Análise da concentração de infiltrados (A), angiogênese (B) e Fibroplasia (C) nos grupos no tempo de 2 e 7 dias após intervenção.

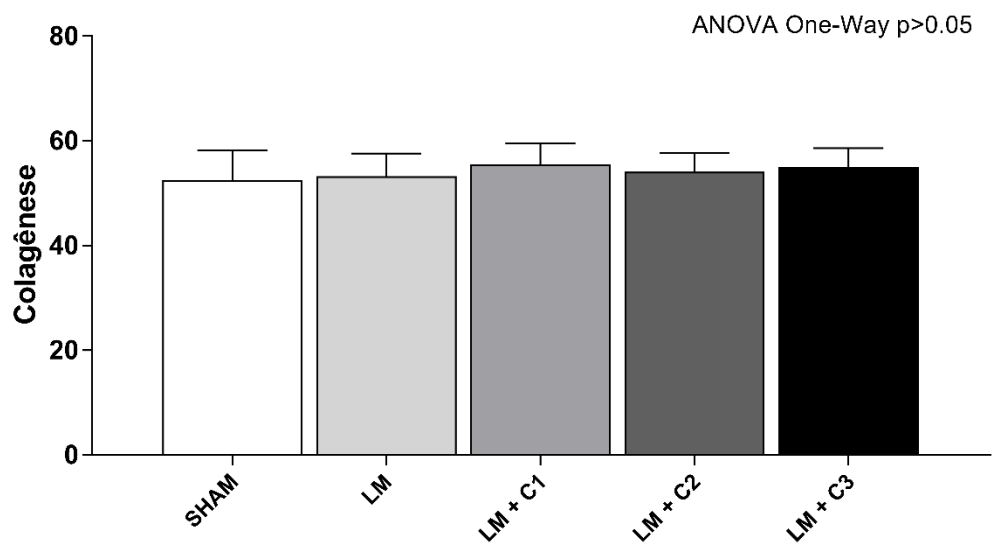
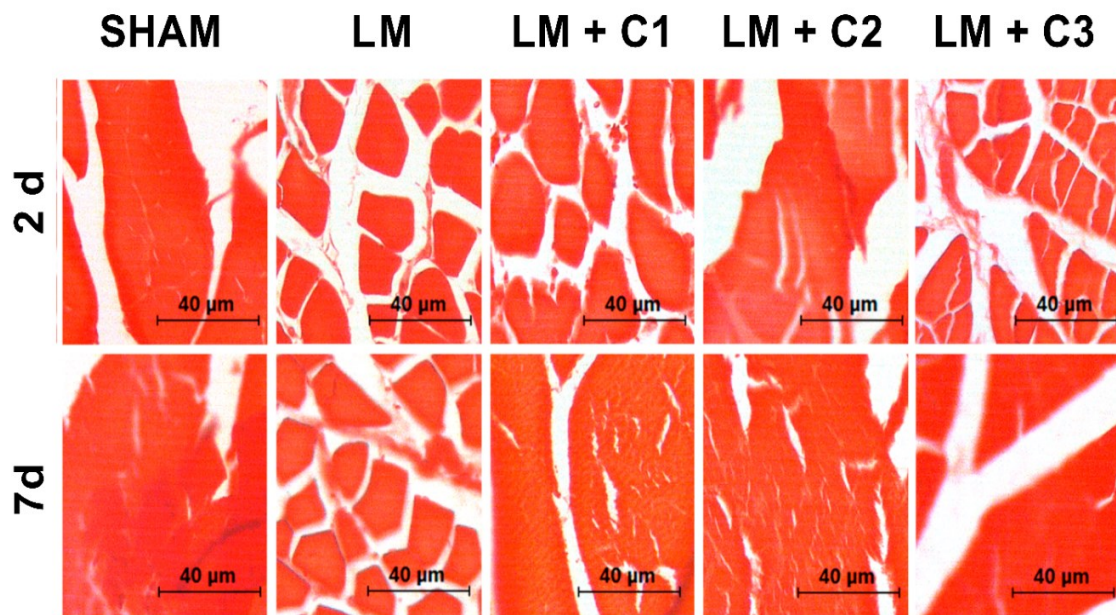


Legenda: Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM +C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$.

3.2.4 Colagênese

A Figura 9, contém imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio ilustrando atividade de colagênese. e o gráfico demonstrando o resultado da análise ANOVA *One-Way*, na qual, todos os grupos apresentam comportamento semelhante na formação de colágeno, não havendo diferença na comparação entre os grupos.

Figura 9 - Análise da formação de colágeno nos diferentes grupos, verificado nos dias 2 e 7 após intervenções.



4 DISCUSSÃO

Ao realizar este estudo, tivemos dois objetivos principais: I) verificar se aplicar a crioterapia apenas nas primeiras 24 h, após lesão muscular por contusão, seria suficiente para controlar o processo inflamatório e estresse oxidativo sem causar atraso no reparo tecidual; II) verificar quantas aplicações, seguindo frequência geralmente realizada na prática clínica, seriam suficientes para atingir tais objetivos.

A análise conjunta dos resultados apresentados evidencia que a crioterapia aplicada antes das 24 h após lesão muscular por contusão pode controlar parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e histológicos. Em relação ao segundo questionamento, pode ser visto nos resultados que a partir de duas aplicações são observados efeitos positivos e um controle do processo. Mas, para um melhor efeito terapêutico do fator crioterapia observado nesse estudo, recomenda-se uma frequência de três aplicações intermitentes com o objetivo de controlar o processo inflamatório.

As citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) não apresentaram diferença entre os grupos quando analisadas 2 dias após lesão. No entanto, 7 dias após lesão, apresentaram níveis altos de concentração no grupo submetido a LM, sugerindo que o grupo LM ainda estava na fase de limpeza tecidual (Figura 3). As citocinas liberadas pelos neutrófilos e macrófagos, tais como, interleucinas (IL-1 β e IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), desempenham papel fundamental na inflamação, promovendo sinalização e recrutamento celular com objetivo de realizar fagocitose e remoção do tecido necrosado (SERRANO, 2008). No entanto, esta resposta quando ocorre de maneira exacerbada ou por período prolongado, pode prejudicar a fase de reparo tecidual, uma vez que esta fase é sinalizada por meio da redução dos níveis de citocinas pró inflamatórias e aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento (BOGLIOLO, 2004; KUMAR, 2013). O grupo que recebeu três aplicações de crioterapia (LM + C3) apresentou valores semelhantes ao grupo Sham na concentração de citocinas pró-inflamatórias, isto indica uma transição da fase aguda de fagocitose e limpeza tecidual, para fase crônica, de reparo tecidual no grupo LM + C3.

As citocinas anti-inflamatórias, como a IL10 desempenham importante papel na fase tardia da inflamação inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e na ativação e troca fenotípica de macrófagos M1 para M2 (LANG et al., 2002; MOSSER, 2003; VILLATA, 2011). Além da sua atuação no processo inflamatório, a IL-10 desempenha importante papel na fase de reparo tecidual por ser capaz de aumentar a fusão celular e ampliar a proporção de células

que expressam miogenina (ARNOLD et al., 2007), importante fator de diferenciação miogênica (FÜCHTBAUER, EM.; WESTPHAL, H. 1992; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017). Podemos observar na Figura 3, o efeito positivo do fator crioterapia no grupo LM + C3 sobre as citocinas (Figura 3 e Apêndice A e B). O tratamento proporcionou um aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 3 D), associado à redução das pró-inflamatórias. Isto demonstra importante ação terapêutica da crioterapia no controle do processo inflamatório e favorecimento da etapa de reparo.

Merrick et al. (1999) e Schaser et al. (2007) analisaram de maneira independente, o efeito da aplicação prolongada de crioterapia, e demonstraram resultados satisfatórios nos parâmetros avaliados por cada um. No entanto, o uso prolongado da crioterapia nos tecidos pode induzir a lesões causadas pelo frio (KNIGHT, 1995) e não é comumente utilizado na prática clínica. Desta forma, Oliveira et al., a fim de mimetizar as frequências de aplicações realizadas na prática clínica, analisaram em três estudos distintos o efeito de três aplicações intermitentes de crioterapia após lesão muscular induzida por criolesão, na atividade oxidante (CS e LDH) (OLIVEIRA et al., 2013) na área da lesão e peso do membro lesionado em dois momentos: 4 h 30 min após lesão (OLIVEIRA NML; RAINERO EP; E SALVINI TF., 2006) e 24 horas após lesão (OLIVEIRA NML; GAVA AD; E SALVINI TF., 2007). E observaram efeito positivo da crioterapia na atividade oxidante e tamanho da área lesada avaliada 4 h e 30 min após lesão. No entanto, quando avaliado 24 h após lesão, sugerem que três aplicações de crioterapia não são suficientes para conter a área lesionada e a inflamação (OLIVEIRA NML; GAVA AD; E SALVINI TF., 2007). Os resultados da atividade oxidante no presente estudo divergem dos encontrados por Oliveira et al. (2007). Tal fato pode ter ocorrido devido ao modelo de lesão utilizado ser diferente do realizado em nosso estudo. Embora as fases do processo de reparo muscular sejam similares entre os diferentes tipos de músculos e lesões, a cinética e a amplitude de cada fase podem variar dependendo da extensão da lesão, do músculo lesionado ou do modelo animal (GROUNDS, 1992; PAVLATH et al., 1998).

Ao analisar o conteúdo oxidativo de DCF e nitrito (Figura 4 A e B), os grupos LM + C2 e LM + C3 tiveram níveis destes marcadores próximos aos níveis do grupo Sham e ambos apresentaram diferença significativa comparados ao grupo LM. Níveis elevados de Óxido Nítrico (NO), aqui avaliados por meio do nitrito, são capazes de promover vasodilatação (SCHASER et al., 2007) e favorece a migração de mais células inflamatórias para o local do tecido e formação de edema. Além disso, podem ativar o fator de transcrição NF-κB (TIDBALL, 2017), o qual é responsável por induzir a transcrição de mais citocinas pró-

inflamatórias (PEREIRA et al., 2014) e interferir no processo de reparo tecidual, inibindo a miogênese por meio de vários processos (VIEIRA RAMOS et al., 2016). A atenuação destes oxidantes promovidos pela crioterapia nos grupos LM + C2 e LM + C3, nos fornece indicativo de que a crioterapia é capaz de prevenir a resposta inflamatória exacerbada.

Ao analisar o dano oxidativo, o grupo LM apresentou aumento da carbonilação de proteína e redução do grupo sulfidril em dois dias após lesão, compatível às alterações encontradas em lesões musculares. Em contrapartida, o grupo LM + C3 apresentaram valores próximos ao grupo Sham, indicando que o grupo que recebeu crioterapia teve menor dano oxidativo. A excessiva produção de EROS precisa ser contrabalanceada por agentes antioxidantes. Um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e as espécies reativas geradas podem determinar um prejuízo funcional às células. As defesas antioxidantes podem atuar de forma associada ou independente por duas vias: enzimáticas e não enzimáticas. O sistema enzimático, foi avaliado pela atividade da enzima SOD (superóxido dismutase), e a via não enzimática por meio da glutatona (GSH) (URSO e CLAKSON, 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Ao observar os valores SOD, estes apresentaram níveis altos no grupo LM e nos grupos que receberam apenas uma ou duas aplicações de crioterapia. O aumento na atividade da SOD presente no grupo LM pode sinalizar elevada produção de H₂O₂, no presente estudo avaliada indiretamente a partir dos níveis de DCF, o qual é considerado um marcador de produção de peróxido por células danificadas. Ainda, o grupo LM apresentou redução nos níveis de GSH, sinalizando desequilíbrio no sistema antioxidante, que associada à maior produção de H₂O₂ pode estar associada a maior dano tecidual. Por outro lado, o grupo submetido às três aplicações de crioterapia (LM + C3), manteve os valores de GSH e SOD próximos ao grupo Sham nos dois prazos analisados.

Podemos observar pela histologia que o grupo que recebeu três aplicações de crioterapia apresentaram redução no número de infiltrados quando comparado ao grupo LM. Uma possível justificativa para apenas o grupo que recebeu três aplicações de crioterapia tem efeito positivo na redução leucocitária, pode ser devido ao fato de que os neutrófilos apresentam maior interação com as células do endotélio vascular e migração para o tecido 5 h após lesão muscular (CHIARI et al., 1998). Isso nos direciona para o fato de que a crioterapia com objetivo de controlar o número de infiltrado leucocitário no tecido, deve seguir uma frequência de aplicação que garanta que o tecido receberá a técnica até próximo de 5 h após lesão muscular.

O objetivo para aplicar a crioterapia nas primeiras 24 h após lesão muscular, surgiu do pressuposto que a cascata de sinalização inflamatória ocorre nesse período (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; YANG, HU 2018). No entanto, células envolvidas no processo inflamatório e reparo tecidual, como os macrófagos, atingem o pico de proliferação em média 48 horas após início da cascata inflamatória (YANG, HU 2018). Uma vez que a depleção de macrófagos (XIAO et al., 2016) e o uso prolongado da crioterapia podem causar importante atraso no reparo tecidual, pressupomos que aplicar a crioterapia nas primeiras 24 horas após lesão muscular, seria capaz de controlar o processo inflamatório sem causar atraso no processo de reparo tecidual. Afinal, uma vez que o pico de migração do macrófago ocorre 48 h após lesão, estes ainda estariam em grande número nos tecidos.

Vieira Ramos et al. (2016) e Haupenthal et al. (2020) observaram o efeito da crioterapia aplicados nas primeiras 48 horas após lesão, seguindo a frequência de três aplicações diárias, conforme realizado neste estudo. Ambos estudos demonstram efeitos positivos semelhantes nos marcadores de dano oxidativo e inflamatórios encontrados que os resultados apresentados nesse estudo. Isto sugere que a crioterapia desempenha papel fundamental no controle do processo inflamatório quando aplicada nas primeiras 24 h, e que aplicação por 48 h pode intensificar esses efeitos, no entanto, não se mostra fundamental para que esses efeitos sejam alcançados. O resultado deste estudo mostra que no prazo de 24 h a crioterapia causou redução nos níveis de marcadores pró-inflamatórios, estresse oxidativo e foi também capaz de gerar aumento da interleucina anti-inflamatória IL-10, o que indica que a crioterapia ocasiona um controle do processo inflamatório agudo e favorece o processo de regeneração tecidual. Por outro lado, talvez aplicar crioterapia por mais de 24 horas possa induzir efeitos indesejados no processo de reparo tecidual, como diminuição da expressão de macrófagos com fenótipo M2 importantes neste processo (TIDBALL; VILLALTA, 2010; XIAO et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2017).

Diferentes mecanismos podem justificar os efeitos mediados pela hipotermia no processo inflamatório e marcadores de estresse oxidativo após lesão muscular. No processo inflamatório, a crioterapia se mostra capaz de promover a contenção de vias pró-inflamatórias, como a da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (DIESTEL et al., 2008) e inibição da transcrição de genes de citocinas dependentes do fator nuclear kappa B (NF-kB) (YENARI e HAN, 2013). A crioterapia também promove a manutenção dos mecanismos homeostáticos reduzindo a produção de ROS e evitando o aumento da atividade do sistema antioxidante após a lesão (MERRICK et al., 1999; CARVALHO et al., 2010; PUNTEL et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2017; DOS SANTOS HAUPENTHAL et al., 2020). Além de ser capaz de diminuir a expressão

de moléculas de adesão na superfície de células inflamatórias (INAMASU et al., 2001) e promover vasoconstrição (SCHASER et al., 2007). Estes fatores associados, favorecem a diminuição da pressão hidrostática e dificultam o processo de diapedese, reduzindo a concentração de infiltrados leucocitários e favorecendo a sobrevivência de células viáveis.

Apesar do modelo de lesão por contusão utilizado neste estudo ser amplamente utilizado em estudos com uso de crioterapia (SMITH et al., 1993; MARTINS et al., 2016; SINGH; LONBANI; et al., 2017), a magnitude da lesão é baixa e, portanto, pode influenciar na resposta inflamatória, uma vez que esta é utilizada como mecanismo fisiológico para reestabelecer a homeostase tecidual. Uma lesão tecidual pequena, por si só induz a uma resposta inflamatória de menor intensidade, o que pode justificar alguns marcadores não terem apresentado diferença significativa na comparação entre os grupos que receberam crioterapia e o grupo LM com o Sham, como foi o caso do TNF alfa no segundo dia após lesão e da angiogênese e Colagênese analisadas pela histologia.

A aplicação de crioterapia pode induzir sensação de dor quando o tecido atinge temperaturas abaixo de 15° C (MORAN, 1998). Um dos mecanismos mais aceitos e que explicam esse fenômeno, se deve pela ativação dos nociceptores térmicos TRPA1 e do não específico TRPM8, pertencentes a família dos canais de potencial receptor transitório (TRP) (FOULKES; WOOD, 2007). Esses canais estão expressos na membrana dos neurônios sensitivos, e sua ativação pode estar relacionada com a sensação dolorosa relatada nos minutos iniciais da aplicação da crioterapia. No presente estudo, não foram avaliados a ativação desses receptores pela aplicação das bolsas de gelo. Sugere-se em estudos futuros, incluir esta análise a fim de observar melhor a ativação e tempo de resposta desses receptores térmicos durante aplicação da crioterapia.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, a crioterapia aplicada nas primeiras 24 h após lesão muscular por contusão foi capaz de controlar os parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo, bem como de reduzir o número de infiltrados leucocitários sem causar atraso no reparo tecidual. A partir de duas aplicações já é possível observar efeitos positivos. Para garantir ação eficaz da crioterapia, recomenda-se utilizar uma frequência de três aplicações intermitentes a fim de controlar o processo inflamatório e prevenir lesão secundária aos tecidos por exacerbação do processo inflamatório.

6 REFERENCIAS

AKSENOV MY, MARKESBERY WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**. 302(2):141–145, 2001.

ARNOLD, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **The journal of experimental medicine**, v. 204, n. 5, p. 1057–1069, 2007.

BENCZE, M. *et al.* Proinflammatory Macrophages Enhance the Regenerative Capacity of Human Myoblasts by Modifying Their Kinetics of Proliferation and Differentiation. **The American Society Gene & Cell Therapy**, v. 20, n. 11, p. 2168–2179, 2012.

BOGLIOLO L, BRASILEIRO F, BOGLIOLO G. Patologia geral, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.3ed.

BUGAJ R. The cooling, analgesic, and rewarming effects of ice massage on localized skin. **Physical Therapy**. 55(1):11–19, 1975.

BLEAKLEY, C. M.; MCDONOUGH, S. M.; MACAULEY, D. C. Cryotherapy for acute ankle sprains: a randomised controlled study of two different icing protocols. **British journal of sports medicine**, v. 40, p. 700–705, 2006.

CHAE, S. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. **Biomaterials**. 25(5):843–850, 2004.

CHARGE, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiology Review**, v. 84, p. 209–238, 2004.

CHAZAUD, B. *et al.* Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. **The Journal of cell biology**, v. 163, n. 5, p. 1133–1143, 2003.

CHESTERTON, L. S.; FOSTER, N. E.; ROSS, L. Skin temperature response to cryotherapy. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 83, n. 4, p. 543–39 549, 2002.

COLLINS, N. C. Is ice right ? Does cryotherapy improve outcome for acute soft tissue injury? **Emergency medicine journal**, v. 25, p. 65–68, 2008.

CRISCO, J. J. *et al.* A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. **The American journal of sports medicine**, v. 22, n. 5, p. 702–710, 1994.

DANTAS, M. G. B. *et al.* Creation of a contusion injury method for skeletal muscle in rats with differing impacts. **Acta cirurgica brasileira**, v. 32, n. 5, p. 369–375, maio 2017.

- DIESTEL A. *et al.*, Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells. **Cryobiology**. 57(3):216–222, 2008.
- DEAL, D. N. *et al.* Ice reduces edema. A study of microvascular permeability in rats. **Journal of bone and joint Surgery**, v. 84–A, n. 9, p. 1573–1578, 2002.
- DOS SANTOS HAUPENTHAL, D. P *et al.* Effects of cryotherapy on the regeneration process and muscular mechanical properties after lacerative injury model. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, 2020.
- DYKSTRA, J. H. *et al.* Comparisons of cubed ice, crushed ice, and wetted ice on intramuscular and surface temperature changes. **Journal of Athletic Training**, v. 44, n. 2, p. 136–141, 2009.
- FÜCHTBAUER, E. M.; WESTPHAL, H. MyoD and Myogenin Are Coexpressed in Regenerating Skeletal Muscle of the Mouse. **Developmental Dynamics**, v. 193, p. 34–39, 1992.
- FOULKES, Tom; WOOD, John. Mechanisms of Cold Pain. **Channels**, v. 1, n. 3, p. 154-160, 2007.
- GROUND, M. D. *et al.* Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. **Cell & Tissue Research**, v. 267, p. 99–104, 1992.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free radical in biology and medicine**. New York: University Press., 2007.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M *et al.* The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, p. 10-18, 2017.
- INAMASU J, *et al.*, Intra-ischemic hypothermia attenuates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and migration of neutrophil. **Neurological Research**. 23(1):105–111, 2001.
- JANWANTANAKUL, P. Cold pack/skin interface temperature during ice treatment with various levels of compression. **Physiotherapy**, v. 92, n. 4, p. 254–259, 2006.
- JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, M.; KALIMO, H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. **Muscle ligaments and tendons journal**, v. 3, n. 4, p. 337–345, 2013.
- KANLAYANAPHOTORN, R.; JANWANTANAKUL, P. Comparison of skin surface temperature during the application of various cryotherapy modalities. Archives of **Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 86, n. 7, p. 1411–1415, 2005.
- KENNET *et al.*. Cooling efficiency of 4 common cryotherapeutic agents. **Journal of Athletic Training**. 42(3):343–348, 2007.
- KUMAR V, ABBAS AK, ASTER JC. **Robbins patologia básica**. Rio de Janeiro. Elsevier. 2013;9 ed.

- KNIGHT, K. L. **Cryotherapy in Sport Injury Management.** *Human Kinetics.* 301. 1995.
- KHOSHNEVIS S, Craik NK, Diller KR. Cold-induced vasoconstriction may persist long after cooling ends: an evaluation of multiple cryotherapy units. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy.** 23(9):2475–2483, 2015.
- LANG R *et al.*, Shaping Gene Expression in Activated and Resting Primary Macrophages by IL-10. **The Journal of Immunology.** 169(5): 2253–2263, 2002.
- LEVINE RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology.** 186:464-478, 1990.
- MARTINS, C. N. *et al.* Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats. **Physiotherapy,** v. 102, n. 4, p. 377–383, dez. 2016.
- MERRICK, M. A. *et al.* A preliminary examination of cryotherapy and secondary injury in skeletal muscle. **Medicine & Science in Sports & Exercise,** v. 31, n. 11, p. 1–9, 1999.
- MERRICK, M. A. Secondary Injury After Musculoskeletal Trauma: A Review and Update. **Journal of Athletic Training,** v. 37, n. 2, p. 209–217, 2002.
- MOSSER DM. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology.** 2003;73(2):209–212.
- MORIN C, BUSHNELL MC. Temporal and qualitative properties of cold pain and heat pain: A psychophysical study. **Pain** v. 74, p. 67-73, 1998.
- MYRER, J. W.; HECKMANN, R.; FRANCIS, R. S. Topically applied dimethyl sulfoxide. Its effects on inflammation and healing of a contusion. **The American journal of sports medicine,** v. 14, n. 2, p. 165–169, 1986.
- OLIVEIRA, N. M. L.; RAINERO, E. P.; SALVINI, T. F. Three intermittent Sessions of cryotherapy reduce the secondary muscle injury in skeletal muscle of rat. **Journal of Sports Science and Medicine,** v. 5, p. 228–234, 2006.
- PAVLATH, G. K. *et al.* Heterogeneity Among Muscle Precursor Cells in Adult Skeletal Muscles With Differing Regenerative Capacities. **Developmental Dynamics,** v. 212, p. 495–508, 1998.
- PEREIRA, M. G. *et al.* Leucine Supplementation Accelerates Connective Tissue Repair of Injured Tibialis Anterior Muscle. **Nutrients,** v. 6, p. 3981–4001, 2014.
- PIANA, L. E. *et al.* The Cold , Hard Facts of Cryotherapy in Orthopedics Take-Home Points Benefits of Cryotherapy. **The American Journal of Orthopedics,** v. 47, n. 9, p. 1–13, 2018.
- PUNTEL, G. O. *et al.* Therapeutic cold : An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. **Free Radical Research,** v. 45, n. 2, p. 133–146, 2010.

- VIEIRA RAMOS, G. *et al.* Cryotherapy Reduces Inflammatory Response Without Altering Muscle Regeneration Process and Extracellular Matrix Remodeling of Rat Muscle. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep18525>>.
- RIZZI, C. F. *et al.* Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF) - k B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, p. 704–713, 2006.
- SERRANO AL *et al.*, Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. **Cell Metabolism**. 7: 33–44, 2008.
- SIQUEIRA *et al.*, Multiple cryotherapy applications attenuate oxidative stress following skeletal muscle injury. **Redox Report**. v.22 n. 6 :323–329, 2017.
- SCHASER, K. *et al.* Prolonged Superficial Local Cryotherapy Attenuates Microcirculatory Impairment, Regional Inflammation, and Muscle Necrosis After Closed Soft Tissue Injury in Rats. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 1, p. 93–102, 2007.
- SILVEIRA, P. C. L. *et al.* Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. **Lasers Medical Science**, v. 28, p. 431–436, 2013.
- SILVEIRA, P. C. L.; VICTOR, E. G.; *et al.* Effects of phonophoresis with gold nanoparticles on oxidative stress parameters in a traumatic muscle injury model. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 916–922, 2016a.
- SILVEIRA, P. C. L.; SCHEFFER, D. DA L.; *et al.* Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. **Free Radical Research**, v. 50, n. 5, p. 503–513, 2016b.
- SMITH, C. *et al.* The Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury Illuminating Complexities. **Sports Medicine**, v. 38, n. 11, p. 947–969, 2008.
- SOUZA, J. DE; GOTTFRIED, C. Muscle injury: Review of experimental models. **Journal of electromyography and kinesiology**, p. 1–8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelekin.2013.07.009>>.
- SINGH, D. P.; BARANI LONBANI, Z.; *et al.* Effects of Topical Icing on Inflammation, Angiogenesis, Revascularization, and Myofiber Regeneration in Skeletal Muscle Following Contusion Injury. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 93, 2017.
- SRIKUEA, R. *et al.* Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 37, n. 11, p. 1078–1086, nov. 2010.
- STAUBER, W. T.; FRITZ, V. K.; DAHLMANN, B. Extracellular matrix changes following blunt trauma to rat skeletal muscles. **Experimental and molecular pathology**, v. 52, n. 1, p. 69–86, fev. 1990.
- STÅLMAN A *et al.*, Tissue with Postoperative Cryotherapy. **J Bone Joint Surg Am**. 93:1961–1968, 2011.

- SWENSON, C.; SWARD, L.; KARLSSON, J. Cryotherapy in sports medicine. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 6, p. 193–200, 1996. 43
- TAKAGI, R. *et al.* Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. **Journal of applied physiology**, v. 110, p. 382–388, 2011.
- TIDBALL, J. G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. **nature review immunology**, v. 17, n. 3, p. 165–178, 2017.
- TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, p. 1173–1187, 2010.
- URSO, M. L. Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? **Journal of applied physiology**, v. 115, p. 920–928, 2013.
- VILLALTA, S. A. *et al.* Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 4, p. 790–805, 2011.
- XIAO, W.; LIU, Y.; CHEN, P. Macrophage Depletion Impairs Skeletal Muscle Regeneration: the Roles of Pro-fibrotic Factors, Inflammation, and Oxidative Stress. **Inflammation**, v. 39, n. 6, p. 2016–2028, dez. 2016.
- YANG, W.; HU, P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 13, p. 25–32, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.01.002>>.
- YANAGISAWA, O *et al.* Effects of cooling on human skin and skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 6, p. 737-745, 2007.
- YENARI MA, HAN HS. Influence of Therapeutic Hypothermia on Regeneration after Cerebral Ischemia. **Bone - Front Neurol Neurosci**. v.32:122–128, 2013.

7 APENDICES

APENDICE A

Tabela 1 - Resultado da comparação aos pares na histologia analisada pela ANOVA *Two-Way* com *Post hoc* de Bonferroni, expressos em média, desvio padrão e intervalo de confiança de todos os grupos 2 e 7 dias após intervenção.

Groups	Infiltrado					
	2 Days			7 Days		
	Mean (SD)	CI 95%	P valule	Mean (SD)	CI 95%	P value
Sham	2.32 (2.02)	-0.91 to 5.54	Ld, C1d, C2b	5.85 (8.70)	-8.0 to 19.70	C1a
LM	150 (28.20)	105 to 194	Sd, C2a, C3d	25.50 (29.90)	-22.1 to 73.10	>0,05
LM + C1	165 (49.70)	85.50 to 244	Sd, C2b, C3d	73.60 (43.40)	4.49 to 143	Sa, C2a, C3a
LM + C2	86.60 (22.50)	50.90 to 122	Sb, La, C1b, C3b	66.40 (42.40)	-1.10 to 134	C3a
LM + C3	7.57 (4.23)	0.84 to 14.30	Ld, C1d, C2b	3.44 (2.74)	-0.93 to 7.81	C1a, C2a
Angiogênese						
Sham	0.81 (0.72)	-0.33 to 1.97	>0.05	0.72 (0.78)	-0.53 to 1.97	>0.05
LM	0.75 (0.36)	0.16 to 1.34	>0.05	0.83 (0.56)	-0.05 to 1.73	>0.05
LM + C1	0.59 (0.18)	0.30 to 0.89	>0.05	0.97 (0.67)	-0.09 to 2.04	>0.05
LM + C2	0.90 (0.11)	0.71 to 1.10	>0.05	1.38 (1.23)	-0.57 to 3.33	>0.05
LM + C3	1.03 (0.92)	-0.44 to 2.50	>0.05	0.53 (0.52)	-0.30 to 1.37	>0.05
Fibroplasia						
Sham	3.41 (3.41)	-2.03 to 8.85	>0.05	16.4 (13.70)	-5.29 to 38.20	>0,05
LM	4.63 (3.52)	-0.97 to 10.20	>0.05	5.63 (3.78)	-0.38 to 11.60	C1c
LM + C1	6.29 (4.06)	-0.17 to 12.70	>0.05	28.80 (6.59)	18.30 to 39.30	Lc, C3c
LM + C2	18.10 (5.17)	9.84 to 26.30	>0.05	17.20 (11.20)	-0.60 to 34.90	>0,05
LM + C3	16.20 (6.99)	5.04 to 27.30	>0.05	3.51 (2.42)	-0.34 to 7.36	C1c
Colagênese						
Sham	48.90 (5.36)	40.40 to 57.40	>0.05	56.10 (3.50)	50.50 to 61.70	>0.05
LM	55.80 (4.65)	48.40 to 63.20	>0.05	50.70 (2.14)	47.30 to 54.10	>0.05
LM + C1	54.50 (4.86)	46.70 to 62.20	>0.05	56.40 (3.54)	50.80 to 62.10	>0.05
LM + C2	55.00 (2.72)	50.70 to 59.30	>0.05	53.20 (4.56)	46.00 to 60.50	>0.05
LM + C3	53.90 (3.32)	48.70 to 59.20	>0.05	56.00 (4.14)	49.40 to 62.60	>0.05

Legenda: SD: Desvio Padrão. CI: Intervalo de Confiança. Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas em cada coluna, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM +C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$. Conjunto de letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Bonferroni ao nível de 5% de significância.

Tabela 2 - Resultado da análise bioquímica das citocinas anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) e pró inflamatórias (IL-10) analisadas pela ANOVA *Two-Way* com *Post hoc* de Bonferroni, expressos em média, desvio padrão e intervalo de confiança de todos os grupos 2 e 7 dias após intervenções.

Groups	TNF α					
	2 Days			7 Days		
	Mean (SD)	CI 95%	P valule	Mean (SD)	CI 95%	P value
Sham	23,48 (3.86)	17.33 to 29.62	>0.05	23.57 (3.28)	18.34 to 28.81	Lc, C1b
LM	36.69 (4.80)	30.73 to 42.65	>0.05	47.71 (13.73)	30.36 to 64.45	Sc, C2a, C3d
LM + C1	20,94 (4.53)	15.31 to 26.57	>0.05	44.34 (10.25)	31.62 to 57.07	Sb
LM + C2	24.42 (4.48)	18.85 to 29.99	>0.05	28.87(7.48)	19.57 to 38.17	La
LM + C3	24.98 (6.94)	16.37 to 33.60	>0.05	16.22 (3.74)	11.57 to 20.87	Ld, C1d
Interleucina-1 (IL-1)						
Sham	3.34 (0.26)	3.02 to 3.66	>0.05	3.91 (1.10)	2.54 to 5.27	>0.05
LM	5.68 (1.00)	4.36 to 6.94	>0.05	6.97 (0.51)	6.33 to 7.61	>0.05
LM + C1	4.52 (1.70)	2.40 to 6.63	>0.05	5.94 (2.72)	2.55 to 9.32	>0.05
LM + C2	4.90 (2.17)	2.20 to 7.60	>0.05	3.97 (1.55)	2.05 to 5.89	>0.05
LM + C3	4.15 (1.22)	2.64 to 5.67	>0.05	4.27 (0.65)	3.45 to 5.08	>0.05
Interleucina-6 (IL-6)						
Sham	26.00 (4.13)	19.42 to 32.57	>0.05	49.15 (5.83)	39.87 to 58.42	>0,05
LM	50.31 (10.98)	36.67 to 63.95	>0.05	67.23 (8.07)	57.21 to 77.25	C3b
LM + C1	33.75 (11.61)	19.32 to 48.17	>0.05	56.61 (14.81)	38.22 to 75.00	>0,05
LM + C2	54.15 (27.55)	19.95 to 88.35	>0.05	41.12 (13.00)	25.00 to 57.00	>0,05
LM + C3	33.26 (13.41)	16.6 to 49.91	>0.05	31.49 (5.09)	25.17 to 37.81	Lb
Interleucina-10 (IL-10)						
Sham	19.87 (6.23)	9.95 to 29.80	>0.05	31.14 (6.73)	20.42 to 41.85	>0.05
LM	16.92 (3.67)	12.36 to 21.47	>0.05	28.91 (6.38)	20.98 to 36.84	>0.05
LM + C1	27.04 (7.80)	14.37 to 33.76	>0.05	33.72 (2.17)	31.02 to 36.42	>0.05
LM + C2	25.84 (5.64)	18.84 to 32.85	>0.05	29.45 (5.41)	22.72 to 36.18	>0.05
LM + C3	29.11 (7.17)	20.21 to 38.02	>0.05	39.75 (2.90)	36.15 to 43.35	>0.05

Legenda: SD: Desvio Padrão. CI: Intervalo de Confiança. Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas em cada coluna, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM +C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$. Conjunto de letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Bonferroni ao nível de 5% de significância.

Tabela 3 - Resultado da análise bioquímica dos marcadores oxidantes (NO, DCF), de dano oxidativo (Sulfidril e Carbonil) e antioxidantes (SOD e GSH) avaliados pela ANOVA *Two-Way*.

Groups	Óxido Nítrico (NO)					
	2 Days			7 Days		
	Mean (SD)	CI 95%	P value	Mean (SD)	CI 95%	P value
Sham	0.98 (0.15)	0.82 to 1.14	Lb	1.08 (0.24)	0.83 to 1.34	C1a
LM	2.15 (0.54)	1.59 to 2.72	Sb, C3b	1.84 (0.17)	1.66 to 2.02	>0.05
LM + C1	1.40 (0.49)	0.89 to 1.91	>0.05	1.99 (0.99)	0.94 to 3.03	C2a, C3
LM + C2	1.38 (0.45)	0.96 to 1.81	>0.05	1.02 (0.24)	0.76 to 1.27	C1a
LM + C3	1.05 (0.31)	0.75 to 1.35	Lb	1.00 (0.12)	0.88 to 1.11	C1b
2,7-diclorofluoresceína fluorescente (DCF)						
Sham	20.42 (3.27)	26.99 to 23.86	La, C1a	21.82 (5.93)	15.59 to 28.04	>0.05
LM	34.53 (8.10)	26.03 to 43.04	Sa, C2a, C3b	32.20 (7.72)	24.19 to 40.41	C2d, C3b
LM + C1	34.46 (5.26)	28.93 to 39.99	Sa, C2a, C3b	20.40 (8.57)	11.40 to 29.40	>0.05
LM + C2	20.50 (7.38)	13.67 to 27.33	La, C1a	11.90 (4.05)	7.64 to 16.15	Ld
LM + C3	18.32 (7.05)	12.43 to 24.22	Lb, C1b	17.83 (4.85)	13.35 to 22.32	Lb
Sulfidril						
Sham	2.09 (0.30)	1.78 to 2.41	C3b	3.95 (1.01)	2.88 to 5.01	Ld
LM	1.36 (0.18)	1.17 to 1.55	C3d	1.49 (0.32)	1.15 to 1.83	Sd, C3b
LM + C1	2.76 (1.22)	1.48 to 4.04	>0.05	2.71 (0.74)	1.96 to 3.50	>0.05
LM + C2	2.51 (0.97)	1.61 to 3.40	>0.05	2.58 (0.61)	1.93 to 3.22	>0.05
LM + C3	4.13 (1.63)	2.62 to 5.64	Sb, Ld	3.53 (0.79)	2.80 to 4.27	Lb
Carbonil						
Sham	0.10 (0.03)	0.07 to 0.14	Ld	0.05 (0.01)	0.04 to 0.06	>0.05
LM	0.30 (0.09)	0.20 to 0.40	Sd, C1d, C2d, C3d	0.12 (0.02)	0.09 to 0.15	>0.05
LM + C1	0.04 (0.01)	0.02 to 0.05	Ld	0.06 (0.04)	0.01 to 0.10	>0.05
LM + C2	0.05 (0.03)	0.01 to 0.09	Ld	0.02 (0.03)	-0.01 to 0.06	>0.05
LM + C3	0.06 (0.09)	-0.02 to 0.15	Ld	0.04 (0.03)	0.01 to 0.07	>0.05
Superóxido dismutase (SOD)						
Sham	0.28 (0.062)	0.21 to 0.35	C2a	0.57 (0.10)	0.46 to 0.68	>0.05
LM	0.65 (0.08)	0.56 to 0.74	>0.05	1.05 (0.11)	0.92 to 1.17	C3a
LM + C1	0.68 (0.24)	0.43 to 0.94	>0.05	1.01 (0.49)	0.50 to 1.53	>0.05
LM + C2	0.81 (0.37)	0.47 to 1.16	Sa, C3a	0.65 (0.37)	0.28 to 1.04	>0.05
LM + C3	0.31 (0.07)	0.24 to 0.38	C2a	0.50 (0.06)	0.44 to 0.56	La
Glutathiona (GSH)						
Sham	0.07 (0.01)	0.06 to 0.08	>0.05	0.18 (0.08)	0.09 to 0.27	La
LM	0.04 (0.01)	0.03 to 0.05	C3a	0.09 (0.00)	0.08 to 0.09	Sa
LM + C1	0.07 (0.01)	0.05 to 0.09	>0.05	0.14 (0.02)	0.11 to 0.17	>0.05

LM + C2	0.12 (0.05)	0.08 to 0.17	>0.05	0.12 (0.05)	0.06 to 0.18	>0.05
LM + C3	0.13 (0.07)	0.07 to 0.20	La	0.10 (0.01)	0.09 to 0.12	>0.05

Legenda: SD: Desvio Padrão. CI: Intervalo de Confiança. Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas em cada coluna, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM +C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$. Conjunto de letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Bonferroni ao nível de 5% de significância.

APENDICE B

Tabela 4 - Resultados da análise bioquímica e histológica das variáveis que não apresentaram interação na análise ANOVA *Two-Way* e foram analisadas pela ANOVA *One-way* com *Post hoc* de Bonferroni.

Análise Bioquímica			
NO			
Groups	Mean (SD)	CI 95%	P valule
Sham	1.03 (0.20)	0.90 to 1.16	Ld, C1b
LM	1.99 (0.41)	1.73 to 2.26	Sd, C2c, C3d
LM + C1	1.69 (0.80)	1.18 to 2.21	Sb, C3b
LM + C2	1.21 (0.40)	0.97 to 1.46	Lc,
LM + C3	1.02 (0.23)	0.89 to 1.16	Ld, C1b
SOD			
Sham	0.43 (0.17)	0.32 to 0.54	Lb, C1b
LM	0.85 (0.22)	0.70 to 0.99	Sb, C3b
LM + C1	0.85 (0.40)	0.59 to 1.11	Sb, C3b
LM + C2	0.74 (0.36)	0.52 to 0.96	C3a
LM + C3	0.41 (0.12)	0.34 to 0.47	Lb, C1b, C2a
IL-1β			
Sham	3.62 (0.81)	3.04 to 4.20	Lb
LM	6.33 (1.01)	5.60 to 7.05	Sb, C3a
LM + C1	5.23 (2.26)	3.60 to 6.85	>0.05
LM + C2	4.43 (1.84)	3.11 to 5.75	>0.05
LM + C3	4.21 (0.92)	3.55 to 4.87	La
IL-10			
Sham	25.5 (8.50)	18.39 to 32.62	>0.05
LM	22.91 (8.00)	17.19 to 28.64	C3a
LM + C1	28.89 (7.42)	23.58 to 34.2	>0.05
LM + C2	27.65 (5.55)	23.68 to 31.61	>0.05
LM + C3	34.43 (7.61)	28.98 to 39.88	La
Histologia			

Angiogênese			
Groups	Mean (SD)	CI 95%	P valule
Sham	0.76 (0.70)	0.18 to 1.35	>0.05
LM	0.79 (0.44)	0.42 to 1.16	>0.05
LM + C1	0.78 (0.49)	0.36 to 1.2	>0.05
LM + C2	1.14 (0.84)	0.43 to 1.85	>0.05
LM + C3	0.78 (0.74)	0.15 to 1.40	>0.05

Colagênese			
Groups	Mean (SD)	CI 95%	P valule
Sham	52.52 (5.68)	47.76 to 57.27	>0.05
LM	53.25 (4.34)	49.62 to 56.88	>0.05
LM + C1	55.45 (4.07)	52.04 to 58.86	>0.05
LM + C2	54.11 (3.61)	51.09 to 57.12	>0.05
LM + C3	54.97 (3.64)	51.92 to 58.01	>0.05

Legenda: SD: Desvio Padrão. CI: Intervalo de Confiança. $p > 0.05$ não há diferença entre os grupos analisados pela ANOVA One-Way. Conjunto de letras formado por maiúscula seguida de minúsculas em cada coluna, identificam com qual grupo houve diferença e a magnitude da diferença pelo teste de Bonferroni. S: Sham. L: Lesão Muscular. C1: LM + C1. C2: LM + C2. C3: LM + C3. a: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.05$. b: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.01$. c: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.001$. d: Post hoc de Bonferroni, com valor de $p < 0.0001$. Conjunto de letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Bonferroni ao nível de 5% de significância.

Tabela 5 - Temperatura superficial da pele antes e após aplicação da crioterapia.

Groups	Temperatura superficial da pele					
	Antes			Depois		
	Mean (SD)	CI 95%	P valule	Mean (SD)	CI 95%	P value
LM + C1	26.0 (2.37)	24.80 to 27.10	>0.05	8.60 (4.30)	6.50 to 10.60	>0.05
LM + C2	26.9 (2.70)	25.60 to 28.10	>0.05	6.50 (3.00)	5.10 to 7.90	>0.05
LM + C3	25.8 (2.80)	24.60 to 27.10	>0.05	8.30 (4.80)	6.00 to 10.50	>0.05

Legenda: SD: Desvio Padrão. CI: Intervalo de Confiança. $p > 0.05$ não há diferença entre os grupos analisados pela ANOVA One-Way.

8 ANEXOS

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 13/08/2019.

Título do projeto	Efeito da frequência de crioterapia no controle do processo inflamatório agudo em modelo de lesão por contusão
Project title	Effect of cryotherapy frequency on the control of the acute inflammatory process in the contusion lesion model
Número do protocolo Protocol number	52/2019/1
Pesquisador principal Principal Investigator	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores Researchers	Daniela de Estéfani, Daniela Pacheco dos santos Haupenthal, Leandro Almeida da Silva, Gustavo de Bem, Carolini Mendes, Rubya Pereira Zacaron, Laura de Roch casagrande, Priscila Soares de Souza, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Germano Duarte Porto.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/09/2019 a 15/09/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	60 dias /200-300g
Número de animais / Gênero	120 / masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Samira da Silva Valvassori
Samira da Silva Valvassori
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 13 de Agosto de 2019.