

# Efeitos da crioterapia, estimulação elétrica transcutânea e da sua associação na atividade elétrica do nervo femoral em ratos

Effects of cryotherapy, transcutaneous electrical stimulation and their combination on femoral nerve electrical activity in rats

Santuzzi CH<sup>1,2</sup>, Gonçalves WLS<sup>1</sup>, Rocha SS<sup>2</sup>, Castro MEC<sup>1,3</sup>, Gouvea SA<sup>2</sup>, Abreu GR<sup>1</sup>

## Resumo

**Contextualização:** Relatos clínicos sugerem que a associação terapêutica entre crioterapia (CRIO) e estimulação elétrica transcutânea (TENS) favorece analgesia local. **Objetivo:** Avaliar a atividade elétrica do nervo femoral (ANF), em repouso e durante a aplicação isolada, e associada de TENS e CRIO em ratos. **Métodos:** Foram utilizados nove ratos (Wistar) adultos com peso de  $\pm 300$ g. Após anestesia (Uretana, 1mg/g i.p.), o nervo femoral direito foi isolado para registro da ANF basal e durante as modalidades analgésicas. Depois da fixação dos eletrodos no terço inferior da coxa direita, foram aplicadas TENS (50Hz, 10mA) por cinco minutos, CRIO isolada e terapia associada (TA) por dez minutos. Os registros contínuos da ANF foram realizados por meio de um amplificador de potenciais de ação, avaliados posteriormente no primeiro, quinto e décimo minuto em unidades arbitrárias (Ua). Utilizaram-se a análise de variância (ANOVA) uma via e o teste de Dunnett como *post-hoc*. Valores expressos como média  $\pm$ EPM e as diferenças fixadas em  $p < 0,05$ . **Resultados:** A atividade do nervo femoral aumentou ( $p < 0,01$ ) na TENS ( $0,358 \pm 0,09$ Ua) e na TA ( $0,230 \pm 0,07$ Ua) e ficou inalterada após CRIO ( $0,063 \pm 0,003$ Ua), em relação ao basal inicial ( $0,009 \pm 0,0003$ Ua). No quinto minuto, observou-se uma significativa ( $p < 0,05$ ) atenuação da ANF na modalidade TA ( $0,144 \pm 0,027$ Ua) versus TENS isolada ( $0,324 \pm 0,089$ Ua). **Conclusões:** A associação entre as modalidades analgésicas não-invasivas CRIO e TENS atenua significativamente os efeitos produzidos pela TENS isoladamente sobre a ANF de ratos anestesiados.

**Palavras-chave:** TENS; atividade nervosa; crioterapia; Fisioterapia; analgesia.

## Abstract

**Background:** Clinical reports suggest that the therapeutic association between cryotherapy (CRYO) and transcutaneous electrical stimulation (TENS) favors local analgesia. **Objective:** To evaluate the electrical activity of the femoral nerve (FNA), at rest and during single and combined application of TENS and CRYO, in rats. **Methods:** Nine adult Wistar rats weighting  $\pm 300$ g were used in this study. After inducing anesthesia (Urethane, 1mg/g i.p.), the right femoral nerve was isolated in order to record the FNA at baseline and during the therapeutic modalities. After attaching the electrodes to the lower third of the right thigh, TENS (50Hz, 10mA) was applied for five minutes, and CRYO and the combined therapy (CT) for ten minutes. The FNA was recorded continuously by means of an action potential amplifier and the recordings from the first, fifth and tenth minutes were subsequently evaluated using arbitrary units (aU). One-way analysis of variance (ANOVA) was used, with Dunnett's test as post-hoc analysis. The values were expressed as the mean  $\pm$ SEM and differences were established at  $p < 0.05$ . **Results:** The femoral nerve activity increased ( $p < 0.01$ ) after TENS ( $0.358 \pm 0.09$ aU) and CT ( $0.230 \pm 0.07$ aU) and was unchanged after CRYO ( $0.063 \pm 0.003$ aU), in relation to the baseline ( $0.009 \pm 0.0003$ aU). In the fifth minute, we observed significant ( $p < 0.05$ ) attenuation of FNA in the CT ( $0.144 \pm 0.027$ aU) in relation to TENS alone ( $0.324 \pm 0.089$ aU). **Conclusions:** The association between CRYO and TENS noninvasive analgesia significantly attenuates the effects produced by TENS alone on the FNA of anesthetized rats.

**Key words:** TENS; nerve activity; cryotherapy; Physical Therapy; analgesia.

Recebido: 04/09/2007 – Revisado: 05/02/2008 – Aceito: 04/08/2008

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória (ES), Brasil

<sup>2</sup> Escola de Ciências da Saúde, Santa Casa de Misericórdia de Vitória (Emescam) – Vitória (ES), Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Fisioterapia, Faculdade Novo Milênio – Vila Velha (ES), Brasil

**Correspondência para:** Glaucia Rodrigues de Abreu, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Avenida Marechal Campos, 1.468, Maruípe, CEP 29040-577, Vitória (ES), Brasil, e-mail: grabreu@npd.ufes.br

## Introdução ::::

A estimulação elétrica transcutânea (TENS) é uma técnica de analgesia aplicada em uma variedade de frequências, intensidades e duração de pulso, classificada como alta frequência (>50Hz), baixa frequência (<10Hz) e burst (alta e baixa frequência alternadas)<sup>1-3</sup>. A TENS do tipo convencional é uma estimulação de alta frequência (50 e 150Hz) e baixa intensidade, que estimula de forma contínua as fibras nervosas de condução rápida. A intensidade não deve provocar contrações musculares, mas apenas percepção parestésica não-desagradável, ajustada de acordo com a sensibilidade do indivíduo<sup>4</sup>. Estudos evidenciam que a intensidade entre dez e 30 miliampères (mA) é mais confortável e não provoca fasciculações significativas no tempo de pulso, variando de 40 a 75µs. Neste tipo de estimulação, a analgesia é imediata ou após dez minutos de aplicação, efeito que perdura de 20 a 30 minutos até duas horas, razão pela qual este método é preferencialmente aplicado no tratamento de dores agudas<sup>1-5</sup>.

Acredita-se que a TENS promova analgesia predominantemente por meio do mecanismo do portão ou teoria das comportas, proposta por Melzack e Wall<sup>5</sup>, que provoca analgesia mediante a ativação seletiva das fibras táteis de diâmetro largo (A-beta), sem ativar fibras nociceptivas de menor diâmetro (A-delta e C). A atividade gerada nas fibras A-beta inibe a atividade em curso dos neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinal<sup>5</sup>. Adicionalmente, o mecanismo analgésico da TENS parece também estar relacionado à ativação de receptores para opióides endógenos, na medula espinal<sup>6</sup>. Estudos recentes demonstram que a baixa frequência de TENS ativa especificamente receptores opióides  $\mu$ , receptores serotoninérgicos e receptores muscarínicos espinais. Por outro lado, a analgesia produzida pela alta frequência de TENS ativaría receptores delta-opióides e receptores muscarínicos na coluna dorsal da medula espinal, além da ativação de receptores delta-opióides supra-espinal<sup>1,6-9</sup>.

Estudos mostram que a aplicação terapêutica da crioterapia (CRIO) reduz gradativamente a transmissão de impulsos nos nervos sensitivos, em função da redução na velocidade de condução das fibras nervosas<sup>10,11</sup>. No entanto, após a aplicação prolongada de gelo, a duração dos potenciais de ação dos nervos sensoriais pode aumentar em virtude do aumento nos períodos refratários. Na prática clínica, as principais indicações para o uso da CRIO são lesões agudas, espasmos musculares e processos inflamatórios<sup>11-13</sup>.

Estudos comprovam que a CRIO e TENS reduzem a dor em pacientes em diversas condições como, por exemplo, no período pós-operatório<sup>14</sup>. Atualmente, com a finalidade de promover analgesia, relatos clínicos têm sugerido a associação

das duas modalidades terapêuticas (CRIO+TENS), para uma melhor resposta no controle da dor. Todavia, o mecanismo eletrofisiológico que envolve a condução nervosa e, portanto, os efeitos analgésicos da associação das técnicas supracitadas, não foram suficientemente esclarecidos na literatura até o presente momento<sup>15-17</sup>. A associação da CRIO e TENS cria um paradoxo entre os mecanismos fisiológicos das duas modalidades terapêuticas: enquanto uma reduz a velocidade de condução nervosa, a outra estimula as fibras nervosas. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da TENS e da CRIO, utilizados isoladamente ou em conjunto, sobre a frequência de potenciais de ação do nervo femoral.

## Materiais e métodos ::::

A investigação foi conduzida de acordo com as normas estabelecidas pelo Guide care and use of laboratory<sup>18</sup> e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), parecer nº 026/2007.

### Animais e desenho experimental

Foram utilizados nove ratos Wistar, em um único grupo, com peso corporal entre 300 e 350 gramas, mantidos no Biotério de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFES. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o guia de pesquisas biomédicas para utilização de animais laboratoriais, como declarado pela Federação da Sociedade Brasileira de Biologia Experimental. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente controlada a 22°C e iluminação artificial, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, com alimentação e água *ad libitum*. O parâmetro avaliado neste estudo foi a atividade elétrica do nervo femoral (ANF) de ratos anestesiados, sem estímulos dolorosos, antes e durante a aplicação das duas modalidades (isoladas e em conjunto), originando três tipos de intervenções: TENS, CRIO e TA.

O desenho experimental utilizado e o tempo de aplicação dos tratamentos foram determinados após a observação do comportamento da frequência dos potenciais de ação em estudos piloto, visto que não existem trabalhos estabelecendo o tempo para tais procedimentos. Assim, o experimento consistiu no registro de medidas contínuas da ANF dos animais, utilizando unidades arbitrárias da ANF integrada, em diferentes intervalos de tempo: antes, durante e após a aplicação das técnicas isoladas e associadas. Entre as intervenções, foi estabelecido o período de seis minutos para que a preparação mostrasse um estável, conforme apresentado na Figura 1. Foram utilizados o primeiro, quinto e décimo minuto como período

de estudo das três intervenções. A unidade de medida da ANF utilizada foi uma integrada, a partir da atividade absoluta do nervo isolado, filtrado e discriminado das atividades elétricas de fundo.

## Procedimentos cirúrgicos e registros da atividade do nervo femoral

Os animais foram anestesiados por injeção única intraperitoneal (i.p.) de Uretana, na dose  $1\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso corporal. A escolha do anestésico se deve ao fato de ser este amplamente utilizado em experimentos que envolvem atividades elétricas, portanto, indicado por produzir menores alterações sobre a atividade do nervo<sup>19,20</sup>. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e o nervo femoral da pata direita exposta por meio de uma incisão cutânea longitudinal retilínea de 1,5 a 2cm de comprimento, na face interna da coxa (região pélvica). O espaço entre os músculos abdutores de coxa e femoral foi dissecado e o plexo vâsculo-nervoso femoral identificado. Foi utilizado microscópio (M900, DF Vasconcelos®, São Paulo, Brasil) para seleção do nervo femoral e posterior acomodação em eletrodos de prata para registro da atividade nervosa. Com a finalidade de evitar lesão, lubrificar e manter a integridade do nervo femoral, foi utilizado óleo mineral, juntamente com vaselina sólida, sobre a incisão. Após esse procedimento, os potenciais de ação extracelulares basais foram registrados em um amplificador (NL 104, Neurolog®, Digitimer, Welwyn Garden, UK). Os sinais foram filtrados (NL 126, Neurolog®, Digitimer, Welwyn Garden, UK) e conectados a um amplificador de áudio (NL 120, Neurolog®, Digitimer, Welwyn Garden, UK) e ligados a um osciloscópio (Tektronix 2205, General Electric®, New Jersey, USA). Posteriormente, foram processados em um discriminador de potenciais de ação Spike trigger (NL 200, Neurolog®, Digitimer, Welwyn Garden, UK) e em um integrador de pulso (NL 601, Neurolog®, Digitimer, Welwyn Garden, UK), sendo simultaneamente digitalizados pelo software Acqknowledge for Windows (Biopac System®, Santa Barbara, California, USA), para posterior análise.

## Estimulação elétrica transcutânea isolada

Utilizou-se TENS (EMPI® Eclipse Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) com intensidade sensorial final de 50Hz, 10mA e por cinco minutos. Os eletrodos da TENS (com diâmetro de 0,5cm) foram fixados com adesivo sobre a articulação do joelho direito, sendo um medial e outro lateral, antes do início do experimento, a fim de evitar possíveis alterações no registro da ANF. A intensidade sensorial foi determinada aumentando os parâmetros até níveis que não se evidenciasse

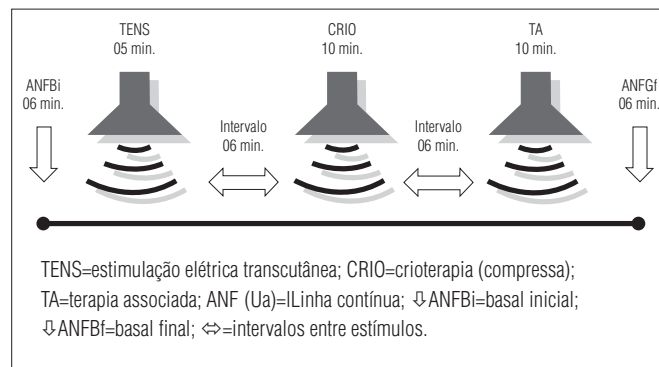
contrações musculares. Essa modalidade terapêutica caracteriza uma aplicação da TENS do tipo convencional e esses parâmetros permaneceram constantes<sup>1,6-9</sup>. Imediatamente após a aplicação da TENS (ao final do quinto minuto), o equipamento foi desligado e aguardados seis minutos para que o nervo atingisse a estabilidade na frequência do potencial de ação (Figura 1). Estudos realizados no laboratório dos pesquisadores deste estudo demonstram que a TENS estimula rapidamente o nervo, e sua resposta é a mesma em cinco ou dez minutos. Optou-se por período menor de estimulação (cinco minutos) para minimizar possíveis lesões durante a exposição do nervo.

## Crioterapia isolada e terapias associadas

Após a estabilização da frequência, a aplicação da CRIO foi iniciada com a fixação de uma compressa de gelo sobre a articulação do joelho direito da pata traseira, durante dez minutos, e registrado os potenciais de ação no nervo femoral. Ao término do procedimento, o gelo foi retirado e novamente aguardado seis minutos, ao final dos quais foram aplicadas as duas modalidades analgésicas associadas, durante dez minutos (Figura 1). O período de dez minutos para aplicação da CRIO foi também definido a partir de estudos pilotos que mostraram ser este o tempo maior necessário para promover efeitos sobre a atividade do nervo. Ao término do estudo, os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico.

## Análise dos dados

Os resultados foram analisados por software estatístico (Graph-Pad® Prism4), no qual se utilizou análise de variância (ANOVA) uma via, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. Os valores (unidades arbitrárias=Ua) foram expressos como média  $\pm$ EPM e as diferenças fixadas em  $p<0,05$ .



**Figura 1.** Protocolo de registro de atividade elétrica do nervo femoral (ANF) em ratos anestesiados, durante aplicação de modalidades analgésicas.

## Resultados

Conforme demonstrado na Figura 2A, no primeiro minuto após o início das modalidades analgésicas, a ANF aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ) na TENS ( $0,358 \pm 0,094$ Ua) e TA ( $0,230 \pm 0,074$ Ua), e não alterou na CRIO ( $0,063 \pm 0,037$ Ua). No quinto minuto, foram observados que as modalidades analgésicas TENS ( $0,324 \pm 0,089$ Ua) e CRIO ( $0,035 \pm 0,015$ Ua) mantiveram as médias de ANF do primeiro minuto, no entanto a TA ( $0,144 \pm 0,027$ Ua) atenuou os níveis da ANF em relação às aplicações isoladas. Verificou-se ainda que no décimo minuto não houve diferenças significativas entre as três modalidades analgésicas, ressaltando que a TENS foi interrompida no quinto minuto. Na Figura 2B, verificou-se que a média de atividade basal do nervo femoral (ANF) nos ratos anestesiados

foi de  $0,009 \pm 0,0003$ Ua. Valores semelhantes aos níveis basais médios de ANF nos intervalos da aplicação das modalidades analgésicas TENS ( $0,004 \pm 0,002$ Ua), CRIO ( $0,001 \pm 0,0006$ Ua) TA ( $0,007 \pm 0,001$ Ua).

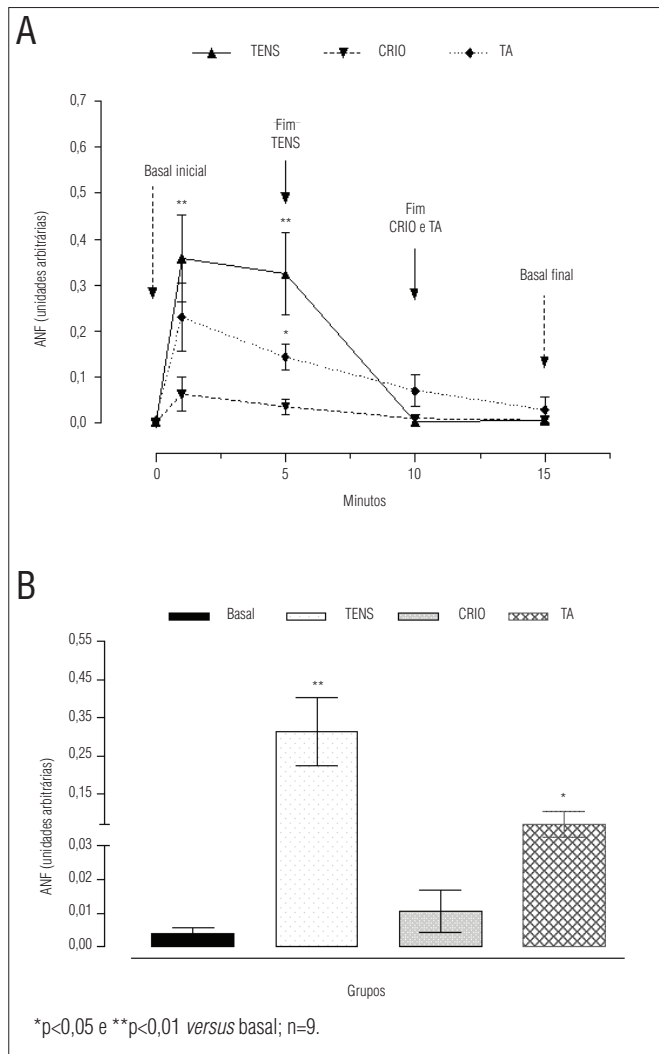
## Discussão

O presente estudo demonstra os efeitos da TENS e da CRIO, sobre a frequência dos potenciais de ação do nervo femoral, utilizadas de forma isolada ou associada. Os dados obtidos mostraram que a TENS isolada em ratos anestesiados aumenta a ANF, a qual foi significativamente atenuada quando se utilizou a TA. No entanto, os resultados também mostram que a CRIO isolada não alterou a ANF dos animais experimentais.

Esses achados demonstraram que a TENS induz tal efeito analgésico por promover uma estimulação de nervos periféricos, especificamente nas fibras proprioceptivas do tato<sup>1-6</sup>. Em contrapartida, a CRIO atenuou a ANF, provavelmente por aumentar os períodos refratários e diminuir a velocidade de condução nervosa<sup>11-15</sup>. Dados da literatura têm demonstrado que o uso da TENS ou da CRIO isoladamente produz efeitos analgésicos importantes em processos inflamatórios agudos e crônicos<sup>1,6,10,11,16</sup>. Estes estudos descrevem que a CRIO produz analgesia por dois principais mecanismos locais, um neuronal e outro vascular. No mecanismo neuronal, a aplicação tópica de gelo diminui a temperatura local, o que reduz os limiares de ativação do nociceptores teciduais e, conseqüentemente, os sinais de transmissão da dor. Em se tratando dos efeitos vasculares da CRIO, a analgesia está associada a redução do fluxo sanguíneo, decorrente da vasoconstrição induzida pelo frio, além da redução do metabolismo neural, apesar de que as vias pelas quais estes eventos ocorrem ainda não estejam bem elucidadas<sup>11-15</sup>.

A TENS classicamente promove analgesia por meio da ativação seletiva das fibras táteis A-beta, as quais inibem a atividade em curso dos neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinal. Além disso, inúmeros estudos na presença de dor demonstram que o mecanismo de ação analgésico da TENS também está relacionado com a ativação de receptores opióides na medula espinal e supra-espinal<sup>1-5,21-23</sup> e não somente pela teoria das comportas.

De fato com o objetivo de potencializar os efeitos analgésicos dessas terapias para supostamente produzir hiperanalgesia, tem-se observado, rotineiramente, na prática clínica, a utilização associada de CRIO e TENS. Apesar da grande frequência (e convencional) do uso simultâneo dessas técnicas na prática fisioterapêutica, a literatura pouco fundamenta os efeitos simultâneos da CRIO e TENS.



**Figura 2.** A. Avaliação temporal dos efeitos das modalidades analgésicas isoladas (TENS ou CRIO) e associadas (TA), sobre a atividade elétrica do nevo femoral (ANF) de ratos anestesiados; B. Determinação da ANF basal, antes e após aplicação das modalidades analgésicas. Valores expressos como média  $\pm$ EPM; ANOVA uma via e teste de Dunnett para múltiplas comparações.



Este estudo demonstrou que a associação das terapias (TENS+CRIO) promove atenuação na ANF anteriormente elevada pela TENS isolada. Tal fato se justifica pela redução da velocidade de condução nervosa promovida pelo gelo<sup>10</sup>; o frio desacelera o transporte axoplasmático, ou seja, o fluxo de substância ao longo do axônio; as concentrações de ATP e fosfato de creatina não mudam, por isso, acredita-se que o bloqueio é causado pela redução metabólica no uso da ATP pelos nervos, em função de uma diminuída atividade enzimática<sup>10-15</sup>. Portanto, é possível se especular que a utilização da CRIO associada a TENS contrapõe o efeito estimulativo e reduz as ações terapêuticas da TENS isolada, além de reduzir a sensibilidade tátil<sup>10,11</sup>, dificultando ainda mais a percepção da intensidade ideal a ser aplicada pela TENS.

Entretanto, a utilização seqüenciada da TENS e CRIO se justifica na presença de dor e outros fatores, como osteoartrites com edemas e pelo efeito desinibitório muscular artrogênico que a CRIO promove. Isto porque os edemas que acompanham a dor nessas afecções articulares sensibilizam os mecanorreceptores capsulares, os quais inibem os motoneurônios alfa medulares e, por conseguinte, os sinais transmitidos ao músculo<sup>10,11</sup>. Apesar desse estudo não ter sido conduzido em situação de

dor ou processo inflamatório, os dados eletroneurográficos obtidos levam a especular que a utilização seqüenciada da TENS e CRIO (nesta ordem), possa melhorar o padrão analgésico<sup>6-8</sup> e permitir melhor manipulação articular, sem diminuir o limiar para dor, respectivamente, fato que clinicamente é de forma inadequada, interpretado como hiperanalgesia<sup>10,11</sup>.

Novos estudos envolvendo processos dolorosos são necessários para melhor elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade neuronal durante o uso das técnicas analgésicas isoladas e associadas.

Finalmente, o aumento na ANF produzido pela TENS em ratos anestesiados e sua associação com a CRIO atenuando este efeito, sugere cautela na aplicação simultânea de CRIO e TENS na prática clínica fisioterapêutica, uma vez que, em animais experimentais, esta associação produz um novo padrão de resposta na ANF.

## Agradecimentos : : : .

Ao apoio financeiro dado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências bibliográficas : : : .

- Sluka KA, Walsh D. Transcutaneous electrical nerve stimulation: basic science mechanisms and clinical effectiveness. *J Pain*. 2003; 4(3):109-21.
- Lampl C, Kreczi T, Klingler D. Transcutaneous electrical nerve stimulation in treatment of chronic pain: predictive factors and evaluation of the methods. *Clin J Pain*. 1998;14(2):134-42.
- Jensen H, Zesler R, Christensen T. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TNS) for painful osteoarthritis of the knee. *Int J Rehabil Res*. 1991;14(4):356-8.
- Katz J, Melzack R. Auricular transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) reduces phantom limb pain. *J Pain Symptom Manage*. 1991;6(2):73-83.
- Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965;150(699):971-8.
- King EW, Sluka KA. The effect of varying frequency and intensity of transcutaneous electrical nerve stimulation on secondary mechanical hyperalgesia in an animal model of inflammation. *J Pain*. 2001;2(2):128-33.
- Maeda Y, Lisi TL, Vance CG, Sluka KA. Release of GABA and activation of GABA(A) in the spinal cord mediates the effects of TENS in rats. *Brain Res*. 2007;1136(1):43-50.
- Somers DL, Clemente FR. Transcutaneous electrical nerve stimulation for the management of neuropathic pain: the effects of frequency and electrode position on prevention of allodynia in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Phys Ther*. 2006;86(5):698-709.
- Bolfe VJ, Ribas SI, Montebelo MIL, Guirro RRJ. Comportamento da impedância elétrica dos tecidos biológicos durante estimulação elétrica transcutânea. *Rev Bras Fisioter*. 2007;11(2):153-9.
- Hopkins J, Ingersoll CD, Edwards J, Klootwyk TE. Cryotherapy and Transcutaneous Electric Neuromuscular Stimulation Decrease Arthrogenic Muscle Inhibition of the Vastus Medialis After Knee Joint Effusion. *J Athl Train*. 2002;37(1):25-31.
- Nadler SF, Weingand K, Kruse RJ. The physiological basis and clinical application of cryotherapy and thermotherapy for the pain practitioner. *Pain Physician*. 2004;7(3):395-9.
- Algafty AA, George KP. The effect of cryotherapy on nerve conduction velocity, pain threshold and pain tolerance. *Br J Sports Med*. 2007;41(6):365-9.
- Tanaka M, Owens NC, Nagashima K, Kanosue K, McAllen RM. Reflex activation of rat fusimotor neurons by body surface cooling, and its dependence on the medullary raphe. *J Physiol*. 2006;572(Pt 2):569-83.
- Kanlayanaphotporn R, Janwantanakul P. Comparison of skin surface temperature during the application of various cryotherapy modalities. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005;86(7):1411-5.
- Bleakley C, McDonough S, MacAuley D. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Sports Med*. 2004;32(1):251-61.
- Rooney SM, Jain S, McCormack P, Bains MS, Martini N, Goldiner PL. A comparison of pulmonary function tests for postthoracotomy pain using

- cryoanalgesia and transcutaneous nerve stimulation. *Ann Thorac Surg.* 1986;41(2):204-7.
17. Lanham RH Jr, Powell S, Hendrix BE. Efficacy of hypothermia and transcutaneous electrical nerve stimulation in podiatric surgery. *J Foot Surg.* 1984;23(2):152-8.
18. Guide for the use of laboratory animals. Washington (DC Research Council); 1996.
19. Abreu GR, Futuro Neto HA, Cabral AM, Vasquez EC. Ouabain produces diverse excitatory effects on afferent baroreceptor nerve activity in SHR and WKY animals. *Clin Exp Hypertens.* 1998;20(1):85-94.
20. Abreu GR, Futuro-Neto HA, Cabral AM, Vasquez EC. L-arginine restores the effects of ouabain on baroreceptor activity and hypertension. *Hypertension.* 1999;34(4 Pt 2):729-32.
21. Sluka KA, Vance CG, Lisi TL. High-frequency, but not low-frequency, transcutaneous electrical nerve stimulation reduces aspartate and glutamate release in the spinal cord dorsal horn. *J Neurochem.* 2005;95(6):1794-801.
22. Ainsworth L, Budelier K, Clinesmith M, Fiedler A, Landstrom R, Leeper BJ, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) reduces chronic hyperalgesia induced by muscle inflammation. *Pain.* 2006;120(1-2):182-7.
23. Rutherford OM, Jones DA, Newham DJ. Clinical and experimental application of the percutaneous twitch superimposition technique for the study of human muscle activation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1986;49(11):1288-91.