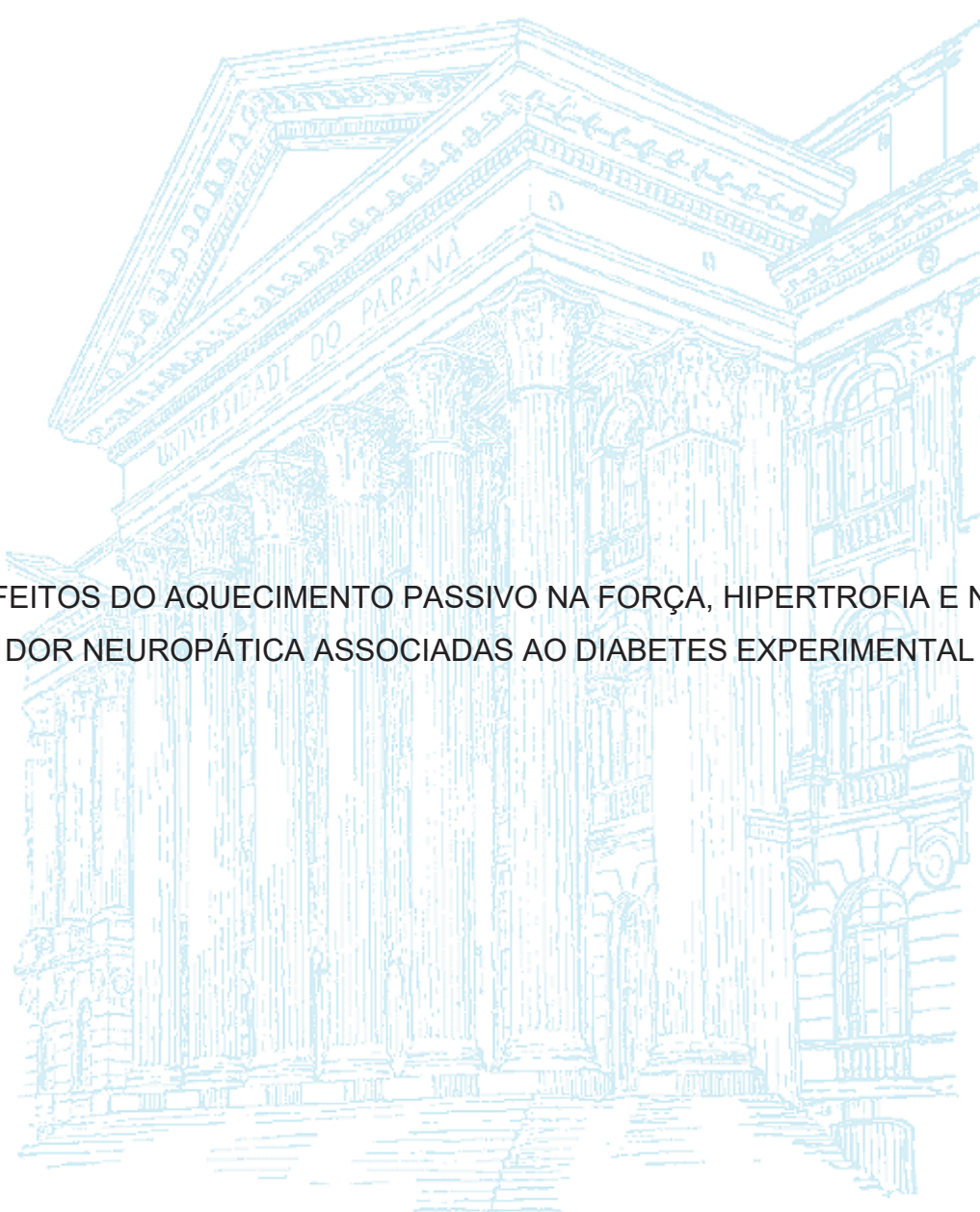


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA AUGUSTA RUY BARBOSA



EFEITOS DO AQUECIMENTO PASSIVO NA FORÇA, HIPERTROFIA E NA
DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADAS AO DIABETES EXPERIMENTAL

CURITIBA

2021

MARIA AUGUSTA RUY BARBOSA

EFEITOS DO AQUECIMENTO PASSIVO NA FORÇA, HIPERTROFIA E NA
DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADAS AO DIABETES EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Educação Física, do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Raul Osiecki

Coorientador: Prof. Dr. Geoffrey Minett

Coorientadora: Prof(a). Dr(a). Joice Maria da Cunha

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Barbosa, Maria Augusta Ruy.

Efeitos do aquecimento passivo na força, hipertrofia e na dor neuropática associadas ao diabetes experimental. / Maria Augusta Ruy Barbosa. – Curitiba, 2021.

83 f. : il.

Orientador: Raul Osiecki

Coorientador: Geoffrey Minett.

Coorientadora: Joice Maria da Cunha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Educação Física.

1. Diabetes – Tratamento. 2. Neuropatia. 3. Dor. 4. Atrofia muscular. 5. Hidroterapia. I. Título. II. Osiecki, Raul. III. Minett, Geoffrey. IV. Cunha, Joice Maria da. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Educação Física.

CDD (20.ed.) 616.462



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EDUCAÇÃO FÍSICA -
40001016047P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação EDUCAÇÃO FÍSICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de MARIA AUGUSTA RUY BARBOSA intitulada: "EFEITOS DO AQUECIMENTO PASSIVO NA FORÇA, HIPERTROFIA E NA DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADAS AO DIABETES EXPERIMENTAL", sob orientação do Prof. Dr. RAUL OSIECKI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/09/2021 17:06:30.0

RAUL OSIECKI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/12/2021 13:59:41.0

PAULO CESAR BARAUCE BENTO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/01/2022 23:51:32.0

ANTONIO CARLOS DOURADO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Novo Edifício do Departamento de Educação Física - Campus Centro Politécnico - Curitiba - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3072 - E-mail: pgedf@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 115829

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 115829

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que desde sempre sonharam todos os meus sonhos comigo. Ao meu pai, professor Ruy Barbosa, por nunca ter nos deixado faltar em casa o que era mais essencial, livros. Por ter me mostrado que a educação é o caminho e que não importa os momentos difíceis se permanecermos verdadeiros àquilo que somos e desejamos para nós. À minha mãe, Juraci Vigilato, por nunca ter medido esforços pra eu ser quem eu sou hoje, pelo amor incondicional e por ser meu maior exemplo de vida. Por ter me mostrado a importância do trabalho duro, da persistência e a recompensa que temos por sermos pessoas de bom coração. Amo vocês e sou grata por tudo que fizeram e tem feito por mim.

Agradeço à todos os professores que passaram pela minha jornada e me fizeram entender o valor e a importância da docência. Doar-se para docência é nobre, ainda mais em um país e sociedade que pouco valoriza os seus professores.

Sendo assim, agradeço ao meu Sensei, professor, Gilmarcos de Bastos, por todos os ensinamentos dentro do karatê e na vida e, que além de tudo, foi um dos grandes responsáveis pela minha escolha pela área da educação física.

Agradeço aos professores Maria Regina Costa e Rogério Goulart, pela amizade e ensinamentos ao longo da minha primeira graduação em licenciatura em educação física. Vocês me ajudaram a enxergar meu propósito dentro da carreira docente e a vontade de mudar o mundo por meio da educação.

Agradeço ao meu orientador, amigo, incentivador, professor Raul Osiecki. Não apenas pela oportunidade de mestrado, à qual já seria um nobre motivo para ser grata, mas por muito mais. Obrigada por ter sido o melhor professor da graduação, por motivar com palavras e atitudes seus alunos à quererem sempre mais para si e para os outros. Obrigada pelos livros emprestados, pelas conversas e conselhos, pelos puxões de orelha necessários e acima de tudo, por ter acreditado em mim. Você não cortou minhas asas e me ensinou a voar.

Agradeço à todos os meus colegas do laboratório do CEPEFIS pela parceria nos anos iniciais do mestrado em especial ao Jhonny Kleber da Silva por estar comigo nos momentos mais difíceis e por ter me ajudado a ser forte, e à minha amiga, parceira de mestrado Bruna Sotomaior, que me ajudou em todas as

etapas desse processo. Desde estudar juntas para o processo seletivo, até a realização dos experimentos e coletas. Aprendi muito ao seu lado e quero levar essa amizade para toda vida.

Agradeço também ao Carlos Henrique Jesus, do laboratório de farmacologia da dor, por ter me auxiliado em várias etapas desse processo, você foi fundamental para conclusão desse trabalho.

Agradeço ao professor Patrick Rodrigues por ter me ajudado desde o início com esse projeto, por todas as riquíssimas contribuições que você deu para esse trabalho e que foram praticamente uma orientação. Muito, muito obrigada.

Agradeço à minha co-orientadora professora Joyce Maria Cunha por ter cedido seu espaço no laboratório da farmacologia da dor, por ter contribuído com o tema central desse projeto, no qual me aventurei pela primeira vez, pela paciência e oportunidade. Para mim, foi um privilégio e muito representativo ter uma professora mulher, que além de tudo é autoridade na área da farmacologia da dor, como co-orientadora.

Agradeço ao meu co-orientador professor Geoffrey Minett por todas as contribuições que realizou neste trabalho e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Agradeço à todo o incentivo de bolsas que recebi do governo federal, financiado pela população brasileira, que me oportunizou vasta experiência na área acadêmica e científica, como o programa de iniciação à docência (PIBID), programa de iniciação científica (PIBIC), ao programa de mobilidade acadêmica Ciência sem Fronteiras, ao Programa de pós-graduação em Educação Física da Universidade Federal do Paraná e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

*“Educação não transforma o mundo.
Educação muda pessoas.
Pessoas transformam o mundo”*

Paulo Freire

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do aquecimento passivo, através da imersão em água quente (42°C) na dor neuropática e nas adaptações musculares em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina. Para tanto, 71 ratos, linhagem Wistar, foram divididos randomicamente em 8 grupos experimentais, DTI2 e DTI4 (diabéticos tratados por duas ou quatro semanas); DC2 e DC4 (diabéticos controle avaliados após duas ou quatro semanas); NTI2 e NTI4 (normoglicêmicos tratados por duas ou quatro semanas); NC2 e NC4 (normoglicêmicos controle avaliados após duas ou quatro semanas). As imersões foram realizadas 5 vezes na semana durante 30 minutos cada sessão. Semanalmente foram avaliados a glicemia sanguínea, peso corporal e alodinia mecânica. Ao final de duas ou quatro semanas foram realizados os testes de campo aberto para atividade locomotora e teste de carga máxima para aferição da força máxima. Em seguida, os animais foram anestesiados e eutanasiados. O músculo sóleo e gastrocnêmio, de ambos os membros, foram dissecados cirurgicamente e pesados. A análise de normalidade dos dados foi averiguada através do teste de Shapiro-Wilk. Quando confirmada, foi realizado uma análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) de três vias para verificar a diferença entre os tempos de coleta (basal, semana 1, 2, 3 e 4), entre os grupos experimentais (tratamento vs. controle) e entre as condições (diabéticos vs. normoglicêmicos) para as análises de glicemia, peso corporal, dor neuropática e temperatura do core. Uma ANOVA de uma via foi realizada para verificar a diferença entre os grupos para os desfechos de força máxima, atividade locomotora e peso muscular. Quando identificada alguma diferença, foi utilizado o *post-hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas. Em todas as análises o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. Os resultados demonstraram que houve interação entre condição vs. tratamento vs. semanas, para o desfecho de alodinia mecânica ($F_{(4,13)}=4,30$; $p=0,003$; $\eta_p^2=0,11$), no qual os diabéticos do grupo controle tiveram uma diminuição progressiva do limiar mecânico ao longo das semanas ($p<0,01$). Para a força muscular, houve um efeito principal do tratamento, no qual a carga máxima foi maior entre os animais tratados comparados ao grupo controle ($F_{(1,61)}=16$; $p=0,01$; $\eta_p^2=0,21$), independente da condição. Sendo que, o ganho de força foi evidente em animais diabéticos tratados durante duas semanas, com aumento de 14,61% ($p=0,02$), quatro semanas, com aumento de 14,29% ($p=0,21$) e animais normoglicêmicos tratados durante quatro semanas, com aumento de 14,4% ($p=0,15$). Em relação à atividade locomotora houve efeito do tratamento entre os diabéticos avaliados após duas semanas de intervenção, no qual a atividade locomotora foi maior nos animais tratados quando comparados ao grupo controle, com um aumento de 36,61% ($p=0,01$). Houve um efeito principal do tratamento no peso corporal, no qual os animais tratados tiveram uma redução no ganho de peso semanal quando comparados ao grupo controle

($F_{(1,33)}=6,22$; $p=0,02$; $\eta_p^2=0,16$). Não houve interação ou efeito principal do tratamento para os desfechos de peso muscular e glicemia sanguínea. A partir dos resultados encontrados, concluímos que o aquecimento passivo foi responsável por atenuar e atrasar o aparecimento da dor neuropática em animais diabéticos e causar alterações nas adaptações musculares de animais diabéticos e normoglicêmicos.

Palavras-chave: diabetes; neuropatia diabética; dor neuropática; atrofia muscular; imersão em água quente.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of passive heating, through hot water immersion (42°C) on neuropathic pain and muscle adaptations in rats with experimental diabetes induced chemically by streptozotocin. Therefore, 71 Wistar rats were randomly divided into 8 experimental groups, DTI2 and DTI4 (diabetics treated for two or four weeks); DC2 and DC4 (control diabetics evaluated after two or four weeks); NTI2 and NTI4 (normoglycemic treated for two or four weeks); NC2 and NC4 (normoglycemic control assessed after two or four weeks). The immersions were performed 5 times a week for 30 minutes each session. Blood glucose, body weight and mechanical allodynia were evaluated weekly. At the end of two or four weeks, open field tests were performed for locomotor activity and maximum load test to measure maximum strength. Then, the animals were anesthetized and euthanized. The soleus and gastrocnemius muscles of both limbs were surgically dissected and weighed. Data normality analysis was verified using the Shapiro-Wilk test. When confirmed, a three-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) was performed to verify the difference between treatment duration (baseline, week 1, 2, 3 and 4) between the experimental groups (treatment vs. control) and between conditions (diabetic vs. normoglycemic) for the analysis of blood glucose, body weight, neuropathic pain and core temperature. A one-way ANOVA was performed to verify the difference between the groups for the outcomes of maximal strength, locomotor activity and muscle weight. When differences were identified, the Bonferroni post-hoc was used for multiple comparisons. In all analyses, the significance level adopted was $p \leq 0.05$. The results showed that there was an interaction between condition vs. treatment vs. weeks, for the outcome of mechanical allodynia ($F(4.13)=4.30$; $p=0.003$; $\eta^2=0.11$), in which the diabetics in the control group had a progressive decrease in the mechanical threshold over the weeks ($p<0.01$). For muscle strength, there was a main effect of the treatment, in which the maximum load was higher among the treated animals compared to the control group ($F(1.61)=16$; $p=0.01$; $\eta^2=0.21$), regardless of condition. The strength gain was evident in diabetic animals treated for two weeks, with an increase of 14.61% ($p=0.02$), four weeks, with an increase of 14.29% ($p=0.21$) and normoglycemic animals treated for four weeks, with an increase of 14.4% ($p=0.15$). Regarding locomotor activity, there was an effect of treatment among diabetics evaluated after two weeks of intervention, in which locomotor activity was greater in treated animals when compared to the control group, with an increase of 36.61% ($p=0.01$). There was a main effect of treatment on body weight, in which treated animals had a reduction in weekly weight gain when compared to the control group ($F(1.33)=6.22$; $p=0.02$; $\eta^2=0.16$). There was no interaction or main treatment effect for muscle weight and blood glucose outcomes. From the results found, we concluded that passive heating was responsible for attenuating and

delaying the onset of neuropathic pain in diabetic animals and causing changes in muscle adaptations in diabetic and normoglycemic animals.

Keywords: diabetes; diabetic neuropathy; neuropathic pain; muscle atrophy; hot water immersion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DESENHO EXPERIMENTAL 1	44
FIGURA 2. DESENHO EXPERIMENTAL 2.....	46
FIGURA 3. CAIXA DE ACRÍLICO UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ESTRESSE TÉRMICO.....	48
FIGURA 4. PROTOCOLO DE IMERSÃO EM ÁGUA QUENTE EM MODELOS ANIMAIS – I.....	49
FIGURA 5. PROTOCOLO DE IMERSÃO EM ÁGUA QUENTE EM MODELOS ANIMAIS – II.....	50
FIGURA 6. TESTE DE VON FREY.....	51
FIGURA 7. TESTE DE CAMPO ABERTO.....	52
FIGURA 8. TESTE DE CARGA MÁXIMA.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resumo dos estudos com utilização do aquecimento passivo nas adaptações musculares em modelos animais.....	35
TABELA 2. Temperatura do core (média±dp) durante protocolo de imersão em água quente (tratados) ou termo neutra (controle).....	56
TABELA 3. Glicemia sanguínea (média±dp) avaliadas nos momentos basal, após primeira (1), segunda (2), terceira (3) e quarta (4) semana de intervenção nos grupos DTI e DC.....	56
TABELA 4. Peso corporal (média±dp) avaliados nos momentos basal, após primeira (1), segunda (2), terceira (3) e quarta (4) semana de intervenção nos grupos DTI, DC, NTI e NC.....	57
TABELA 5. Peso do músculo sóleo relativo ao peso corporal	63
TABELA 6. Peso do músculo gastrocnêmio relativo ao peso corporal	64

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Alodinia mecânica (média $\pm$ dp) avaliadas nos momentos basal, após primeira (1), segunda (2), terceira (3) e quarta (4) semana de intervenção nos grupos DTI, DC, NTI e NC.....	58
GRÁFICO 2. Força máxima relativa ao peso corporal.....	59
GRÁFICO 3. Atividade locomotora.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE – Glicação avançada

ATG – Genes relacionados à autofagia

ATP – Adenosina Trifosfato

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

DC – Grupo diabético controle

PND – Neuropatia periférica diabética

DTI – Grupo diabético com tratamento de imersão em água quente

GRD – Gânglios da raiz dorsal

HSP – Proteína de choque térmico

IGF1 – Fator-1 de crescimento semelhante à insulina

mTOR – Alvo da rapamicida em mamíferos

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNC – Sistema nervoso central

STZ – Estreptozotocina

T1DM – Diabetes *mellitus* tipo 1

UFPR – Universidade Federal do Paraná

VGSC – Canais de sódio independente de voltagem

Ub – Ubiquitina

UPP – Ubiquitina-Proteassoma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2 . OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. HIPÓTESES	20
4. REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1 DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1 (T1DM)	22
4.2 POLINEUROPATIA DIABÉTICA (PND)	24
4.3 DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA	26
4.3.1Indução à dor neuropática em modelos animais	29
4.4 ATROFIA MUSCULAR	30
4.5 AQUECIMENTO PASSIVO	33
4.5.1 Efeitos do aquecimento passivo na dor neuropática e a modulação da proteína chaperona HSP70	38
4.5.2Efeitos do aquecimento passivo nas adaptações musculares	40
5 MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1 ANIMAIS	43
5.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	43
5.3 INDUÇÃO AO DIABETES EXPERIMENTAL	47
5.4 PROTOCOLO DE AQUECIMENTO PASSIVO	47
5.5 TESTE DE ALODINIA MECÂNICA	50
5.6 TESTE DE CAMPO ABERTO	51
5.7 TESTE DE CARGA MÁXIMA	52
5.8 MASSA MUSCULAR	53

6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
7	RESULTADOS	55
7.1	TEMPERATURA DO CORE	55
7.2	GLICEMIA SANGUÍNEA	56
7.3	PESO CORPORAL	56
7.4	ALODINIA MECÂNICA	58
7.5	FORÇA MÁXIMA	59
7.6	ATIVIDADE LOCOMOTORA	60
7.7	PESO MUSCULAR	62
7.7.1	Sóleo direito	62
7.7.2	Sóleo esquerdo	62
7.7.3	Gastrocnêmio direito	63
7.7.4	Gastrocnêmio esquerdo	63
8	DISCUSSÃO	64
8.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO E APLICAÇÕES PRÁTICAS	71
9	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica crônica que afeta aproximadamente 463 milhões de pessoas no mundo (IDF, 2019). Essa doença é caracterizada pelo aumento na concentração de glicose sanguínea, condição conhecida como hiperglicemia, que é ocasionada devido à incapacidade de produção ou utilização da insulina (IDF, 2019). Entre as complicações causadas pelo diabetes destacam-se as macrovasculares (ex. doenças cardiovasculares) e as microvasculares como a neuropatia, por exemplo. (DIMEGLIO, EVAN-MOLINA e ORAM, 2018). A neuropatia, síndrome causada por danos no sistema nervoso periférico e autonômico é de longe a mais prevalente e ocorre em mais da metade dos indivíduos com diabetes (FELDMAN et al, 2019). As neuropatias podem ser classificadas em subgrupos e são causadas por dano difuso e focal do sistema nervoso, sendo a polineuropatia simétrica distal a forma mais comum de neuropatia diabética (FELDMAN et al, 2019) e o tipo a ser abordado neste trabalho como polineuropatia diabética (PND).

A polineuropatia diabética pode se manifestar como uma incapacidade de detectar mudanças de temperatura, vibração, propriocepção, pressão e dor (IDF, 2017). A apresentação clínica da PND pode variar bastante, sendo os sintomas “positivos” ou “negativos”. Os sintomas positivos apresentam um padrão de neuropatia sensorial dolorosa, conhecida como dor neuropática diabética, que inclui sintomas como a alodinia. Os sintomas negativos são geralmente revelados por exames clínicos, que podem consistir em dormência, paralisia ou fraqueza muscular (IDF, 2017).

A discussão acadêmica e clínica da PND é geralmente centrada em seu componente sensorial, enquanto importantes impactos relacionados à PND no sistema motor e neuromuscular são subestimados e negligenciados (ALLEN et al, 2016). Embora muitas farmacoterapias disponíveis (por exemplo, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes e analgésicos opióides) sejam utilizadas no tratamento da dor neuropática, esses medicamentos produzem efeitos colaterais (ZILLIOX e RUSSELL, 2011), fazendo com que haja uma baixa adesão por parte dos pacientes, sem falar na baixa responsividade do tratamento, uma vez que somente 1/3 dos pacientes apresentam 50% de alívio da dor (HUIZINGA e PELTIER, 2007). Além disso, a terapia com fármacos parece não trazer benefícios aos impactos sofridos ao sistema motor e

neuromuscular devido à PND. Alguns estudos tem demonstrado benefícios das intervenções baseadas em treinamento físico no tratamento e prevenção do desenvolvimento ou progressão da PND, tanto em relação às complicações neuromusculares (ORLANDO et al, 2016; STRECKMANN et al, 2014), quanto sensoriais (CHEN et al, 2013). Porém uma intervenção com exercícios parece não gerar grande adesão em pacientes com neuropatia mais avançada, em que os casos de ulceração nos pés são mais comuns (FELDMAN et al, 2019). Sendo assim, faz-se necessário a utilização de terapias alternativas que tratem de forma global os impactos da PND, seja no componente sensorial, como nos componentes neuromusculares e que, sobretudo, gerem adesão por parte dos pacientes.

O aquecimento passivo tem sido utilizado como uma alternativa ao exercício físico (como exercício mimético), mostrando benefícios fisiológicos semelhantes. Esse estresse térmico pode ser administrado de diferentes maneiras (cobertores térmicos, sauna, água quente) (RODRIGUES et al, 2020), embora a imersão em água quente seja considerada um dos métodos mais acessíveis e com maior aplicabilidade prática (MCGORM et al, 2018). Estudos que tem utilizado o aquecimento passivo como exercício mimético, encontraram efeitos práticos importantes, como aumento da massa muscular e força (GOTO et al, 2011; TAMURA et al, 2015), atenuação de atrofia muscular (HAFEN et al, 2019; TAMURA et al, 2015). E todos esses desfechos parecem estar relacionados com o aumento da expressão de Heat Shock Protein 70 (HSP70) (SHIBAGUCHI et al, 2016; OHIRA et al, 2017; KIM et al, 2020b), uma proteína chaperona importante, que parece ter efeitos neuroprotetores (KIM et al, 2020c), em doenças como a PND (MA et al, 2014), dor neuropática (CHEN et al, 2013), e nas adaptações musculares atenuando a atrofia e gerando hipertrofia muscular (MCGORM et al, 2018).

Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da terapia de calor passivo em sujeitos diabéticos acometidos pela neuropatia. Dados os potenciais benefícios gerados pelo aquecimento passivo, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da imersão em água quente na dor neuropática e nas adaptações musculares em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ).

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do aquecimento passivo através da imersão em água quente na dor neuropática e nas adaptações musculares em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do aquecimento passivo (protocolos de duração de 2 e 4 semanas) na força muscular em ratos diabéticos;
- Avaliar os efeitos do aquecimento passivo (protocolos de duração de 2 e 4 semanas) na hipertrofia do muscular de ratos diabéticos;
- Avaliar os efeitos do aquecimento passivo (protocolos de duração de 2 e 4 semanas) na dor neuropática de ratos diabéticos;
- Avaliar os efeitos do aquecimento passivo (protocolos de duração de 2 e 4 semanas) na atividade locomotora de ratos diabéticos;
- Avaliar os efeitos do treinamento com aquecimento passivo (protocolos de duração de 2 e 4 semanas) nas concentrações de glicose sanguínea em ratos diabéticos

3. HIPÓTESES

H0: O aquecimento passivo, através da imersão em água quente não foi capaz de gerar nenhuma alteração no aumento da hipertrofia, nas aquisições de força muscular, na atividade locomotora e na dor neuropática, de animais diabéticos;

H1: O aquecimento passivo, através da imersão em água quente, é capaz de diminuir a dor neuropática em animais diabéticos;

H2: O aquecimento passivo, através da imersão em água quente, é capaz de gerar aumento na produção de força em animais diabéticos;

H3: O aquecimento passivo, através da imersão em água quente, é capaz de gerar aumento na hipertrofia muscular em animais diabéticos;

H4: O aquecimento passivo, através da imersão em água quente, é capaz de aumentar a atividade locomotora em animais diabéticos.

H5: O protocolo de aquecimento passivo, através de imersão em água quente, de 4 semanas é capaz de gerar mais alterações nas adaptações musculares do que o protocolo de 2 semanas.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 (T1DM)

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo aumento na concentração de glicose sanguínea, condição conhecida como hiperglicemia, que é ocasionada devido à incapacidade de produção suficiente de insulina ou pela falta de efetividade no uso da insulina produzida pelo corpo (IDF, 2019). A insulina é um hormônio essencial produzido no pâncreas que permite que a glicose sanguínea entre nas células, onde se transformará em energia para o trabalho biológico. Além disso, a insulina desempenha um papel essencial para o metabolismo das gorduras e proteínas (IDF, 2019).

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (T1DM) é causado, basicamente, por uma reação autoimune na qual o sistema imunológico do corpo ataca as células β produtoras de insulina no pâncreas. Isso resulta na incapacidade de produção de insulina, que passa a ser muito pequena ou inexistente. Neste caso, as pessoas passam a ser dependentes de insulina exógena para manter a concentração apropriada de glicose sanguínea (IDF, 2019). Com o descobrimento da insulina em 1922, a T1DM deixou de ser uma doença terminal para ser uma doença tratável e, embora a sobrevida e saúde dos pacientes tenha aumentado, sobretudo nos últimos 25 anos, ainda não há uma cura para a doença (SKYLLER, 2018).

A diagnose do diabetes é realizada através da concentração de glicose sanguínea que, em jejum, não pode estar acima de 7.0mmol/L (126mg/dL), e de maneira randômica não pode estar acima dos 11.1 mmol/L (200mg/dL) com sintomas, ou com um resultado anormal no teste de tolerância a glicose oral (ADA, 2018). Sem sintomas associados, as concentrações anormais de glicose devem estar presentes em 2 ocasiões. Além disso, a diagnose pode ser feita através da concentração de hemoglobina glicada (HbA1c) que não deve estar acima de 48mmol/mol (6,5%) (ADA,2018). Os sintomas mais comuns da doença são sede excessiva (polidipsia), visão embaçada, sudorese noturna, urinação frequente (poliúria), falta de energia/fadiga, fome constante, perda de peso repentina e cetoacidose diabética (acúmulo de corpos cetônicos no corpo) (IDF, 2019).

Tanto a incidência quanto a prevalência do diabetes do tipo 1 tem crescido mundialmente, com um aumento geral na incidência de 2-3% por ano (MAAHS

et al, 2010; MAYER-DAVIS et al, 2017). E apesar do T1DM ser uma doença poligênica hereditária, esses aumentos não parecem estar relacionados à mudanças genéticas, mas sim à fatores ambientais e de comportamento. Existem algumas exposições ambientais que estão associadas ao diabetes do tipo 1, como por exemplo a dieta na infância e vida adulta, suficiência de vitamina D, exposição precoce a viroses associadas com focos de inflamações (como por exemplo enteroviroses) (REWERS e LUDVIGSSON, 2016). A obesidade é associada com o aumento da aparição do diabetes do tipo 1, capaz de gerar um estresse potencial das células β (REWERS e LUDVIGSSON, 2016; FERRARA et al, 2017). O pico de incidência da diagnose é vista em crianças em idades de 10 à 14 anos (ROGERS et al, 2015; FORGA et al, 2015), atualmente existem 1,1 milhão de crianças e adolescentes, com idade até 20 anos, com T1DM (IDF, 2019), porém a maioria das pessoas vivendo com a doença são adultos (CHIANG et al, 2014).

A patogênese do T1DM ainda tem sido alvo de grande discussão. Ela resulta de uma interação complexa entre as células β pancreáticas, o sistema imunológico adaptativo e inato (HULL, PEAKMAN e TREE, 2017), além de fatores ambientais, genéticos e metabólicos (DIMEGLIO, EVANS-MOLINA e ORAM, 2018). Em relação ao sistema imunológico, sabe-se que a maior frequência de linfócitos T está relacionada com o aparecimento da doença. Essa é uma desordem autoimune, onde as células T atacam as células β produtoras de insulina. Além disso, várias infecções virais são associadas com o T1DM, alimentando a hipótese de que uma infecção viral crônica atípica das células β pode ocasionar uma inflamação crônica e o desenvolvimento da autoimunidade (DIMEGLIO, EVANS-MOLINA e ORAM, 2018). Além das ações do sistema imunológico existem outros fenômenos relacionados com o surgimento da T1DM, como a) uma super expressão das células β – servindo como um sinal de retorno para os linfócitos T citotóxicos, fenômeno conhecido como suicídio das células β ; b) estresse no retículo endoplasmático das células β – levando a morte acelerada das células β ; e c) disfunções/atrofia pancreática (DIMEGLIO, EVANS-MOLINA e ORAM, 2018).

Entre as complicações causadas pelo diabetes destacam-se as macrovasculares (cardiopatia isquêmica, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica) e as microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia)

(DIMEGLIO, EVAN-MOLINA e ORAM, 2018), na qual a neuropatia, síndrome causada por danos no sistema nervoso periférico e autonômico é de longe a mais prevalente e ocorre em mais da metade dos indivíduos com diabetes (FELDMAN et al, 2019). As neuropatias podem ser classificadas em subgrupos e são causadas por dano difuso e focal do sistema nervoso, sendo a polineuropatia simétrica distal a forma mais comum de neuropatia diabética (FELDMAN et al, 2019) e o tipo a ser abordado neste trabalho como polineuropatia diabética (PND).

4.2 POLINEUROPATIA DIABÉTICA (PND)

A neuropatia diabética é um distúrbio neurodegenerativo do sistema nervoso periférico que atinge os axônios sensoriais, autonômicos e motores. A PND progressiva envolve retração e "morte" dos axônios sensoriais terminais na periferia, com preservação relativa dos pericários (corpos celulares). Sua manifestação com distribuição de "bota e luva", referindo-se ao fato de que as mãos e os membros inferiores são os mais comumente acometidos, reflete os danos aos axônios sensoriais mais longos, que são os primeiros a serem afetados com, por exemplo, a perda de axônios epidérmicos da porção distal precedendo a perda em membros mais proximais (FELDMAN et al, 2019; IDF, 2019).

Na PND os danos atingem tanto os axônios periféricos e suas células de Schwann quanto o pericário dos neurônios localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD) (FELDMAN et al, 2019). Essas estruturas são afetadas pela hiperglicemia crônica, podendo levar, em casos mais severos da doença, à desmielinização dos axônios. Existe um apoio mútuo entre as células de Schwann e os axônios, sendo assim, as falhas dessa célula podem gerar diversas alterações como por exemplo a provisão inadequada de suporte citoesquelético, fatores tróficos ou falha na transferência de ribossomo das células de Schwann ao axônio que suporta a tradução de mRNA intra-axonal nos axônios distais (FELDMAN et al, 2017). Outras alterações nos axônios, principalmente os mais distais, ocorrem devido à alterações no pericário neuronal no GRD. Alguns estudos demonstram que essas mudanças ocorrem pela falha de tradução do mRNA, promovendo perda progressiva de síntese e exportação de estruturas essenciais pro axônio (SCOTT, CLARK e ZOCHODNE,

1999), estresse do retículo endoplasmático alterando a função nervosa (LUPACHYK et al, 2013), alteração de moléculas de plasticidade como a neuromodulina e a β -tubulina e alteração nos padrões de expressão das *heat shock proteins* (HSPs) (MA et al, 2015; URBAN et al, 2012). De forma geral, uma disfunção nessas vias gera um processamento anormal de proteínas, disfunção mitocondrial e dano oxidativo, causando perda de função neural periférica (FELDMAN et al, 2017).

Patogênese da PND. Como os receptores de glicose dos neurônios são independentes de insulina, o meio intracelular passa a ficar hiperglicêmico, tanto dos neurônios como das células Schwann, gerando uma saturação das vias metabólicas que utilizam a glicose como substrato para a formação de ATP (FELDMAN et al, 2019). Quando os ácidos graxos de cadeia longa entram nas células de Schwann, cada ciclo de β oxidação forma uma molécula de Acetil-CoA que é transportada para o ciclo do ácido cítrico para a formação de NADH e FADH₂, porém devido à sobrecarga de substrato causada pela hiperglicemia, o sistema de transporte fica saturado e as moléculas de acetil-CoA são convertidas em acilcarnitina, uma substância tóxica para as células de Schwann e neurônios da GRD, aumentando a lesão contínua do sistema nervoso. As acilcarnitinas acumuladas nas células de Schwann são liberadas induzindo degeneração axonal por disfunção mitocondrial (VIADER et al, 2013).

As moléculas de NADH e FADH₂ são transportados nas mitocôndrias para produzir ATP a partir da fosforilação oxidativa. Um substrato produzido nessa via são as espécies reativas de oxigênio (ROS) que são neutralizadas por antioxidantes celulares inatos (VINCENT et al, 2004; VINCENT et al, 2008; VINCENT et al, 2009; VINCENT et al, 2011; VINCENT et al, 2013). Porém, mais uma vez devido ao excesso de substrato causado pelo diabetes, a fosforilação oxidativa falha, ocasionando uma perda na produção de energia e aumento na produção das ROS, que levam à falha mitocondrial e danos metabólicos e oxidativos às células de Schwann e dos neurônios da GRD (FERNYHOUGH e MCGAVOCK, 2015; FERNYHOUGH, 2014). As mitocôndrias disfuncionais perdem a capacidade de trafegar normalmente pelo axônio, promovendo mais lesões axonais (RUMORA et al, 2018).

A hiperglicemia intracelular faz ainda com que a glicose seja metabolizada pelas vias do poliol e hexosamina, responsáveis por aumentar ainda mais a

produção de ROS e inflamação, gerada principalmente por lesão mitocondrial, ocasionando lesão contínua do sistema nervoso (FELDMAN et al, 2017; FELDMAN et al, 2019). Além disso, concentrações elevadas de glicose são também responsáveis pela glicação de diversas proteínas estruturais e funcionais para produzir produtos finais de glicação avançada (AGE). Os AGE são resultados da alteração e perda da função proteica e são responsáveis pela liberação de moléculas pró-inflamatórias e radicais livres (SINGH et al, 2014). Além disso, a presença de excesso de ácidos graxos livres, causados pela hiperlipidemia, também prejudicam as células de Schwann através da produção de ROS e inflamação sistêmica e local (PADILLA et al, 2011).

A PND pode se manifestar como uma incapacidade de detectar mudanças de temperatura, vibração, propriocepção, pressão e dor. A apresentação clínica da PND pode variar bastante, sendo os sintomas “positivos” ou “negativos”. Os sintomas positivos apresentam um padrão de neuropatia sensorial dolorosa, conhecida como dor neuropática diabética, que inclui sintomas como as parestesias (formigamento, queimação) e alodinia. Os sintomas negativos são geralmente revelados por exames clínicos, que podem consistir em dormência, paralisia ou fraqueza muscular (IDF, 2017). Esses sintomas podem ainda ser divididos em disfunções sensoriais (alodinia e parestesia) ou motoras (atrofia e fraqueza muscular) (DYCK, ALBERTS e ANDERSEN, 2011; ENGLAND et al, 2005).

4.3 DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

A dor é um mecanismo protetivo que serve como uma resposta para algum estímulo prejudicial de dano tecidual contínuo ou iminente (COHEN e MAO, 2014). Quando a dor dura mais do que doze semanas ela é caracterizada como dor crônica e estima-se que um quinto das pessoas que tenham dor crônica, apresentam predominantemente a dor neuropática (COHEN e MAO, 2014). A dor neuropática é definida como dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (FELDMAN et al, 2019) e aproximadamente 30% a 50% dos pacientes com neuropatia diabética desenvolvem dor neuropática (ABBOTT et al, 2011). Uma característica distintiva importante da dor neuropática diabética e outros tipos de dor é a combinação de perda sensorial (FELDMAN et al, 2017). As dores são sintomas

sensoriais positivos geralmente relatados como hipersensibilidade à dor com hiperalgesia (quando um estímulo nocivo induz uma resposta exacebarda de dor) ou alodinia (quando um estímulo normalmente não nocivo provoca dor), bem como dor espontânea (independente de estímulo). Outro sintoma da dor neuropática é a sensibilidade reduzida ao toque, à picada de alfinete e à temperaturas quentes e frias, além das parestesias. A distribuição dos sintomas e sinais depende dos nervos afetados na neuropatia, no caso da PND a dor e disfunções sensoriais estão localizados nos dedos dos pés, pés e panturrilhas e, em alguns casos, também nos dedos das mãos e mãos, resultando na distribuição característica de bota e luva (FELDMAN et al, 2017; FELDMAN et al, 2019).

Ainda não está claro porque apenas alguns pacientes desenvolvem a dor neuropática enquanto outros não. Acredita-se que exista uma interação complexa de fatores genéticos, ambientais e psicológicos respondendo às disfunções metabólicas do diabetes e gravidade da neuropatia (VON HEHN et al, 2012). De fato é visto que quanto maior a gravidade da neuropatia e pior o controle glicêmico, tanto os riscos quanto a intensidade da dor tem suas chances de desenvolvimento aumentadas (THEMISTOCLEOUS et al, 2016), porém estas não são condições de causalidade uma vez que existem pacientes com neuropatia grave que nunca desenvolveram a dor (FELDMAN et al, 2017). Dessa forma podemos observar que os mecanismos pra essa condição são complexos. Os mecanismos fisiopatológicos estão relacionadas com disfunções no sistema nervoso periférico (que alteram a excitabilidade dos neurônios sensoriais) e do sistema nervoso central (que aumenta a transmissão sináptica de sinalização nociceptiva) (FELDMAN et al, 2017; FELDMAN et al, 2019; WOLF, 2011).

Mecanismos periféricos da dor neuropática e hiperexcitabilidade dos neurônios sensoriais – Como visto anteriormente, a PND resulta em lesão dos neurônios sensoriais. Essa lesão desenvolve uma hiperexcitabilidade desses neurônios, gerando potenciais de ação mesmo na ausência de um estímulo, causando uma atividade espontânea e alterando a função de estímulo-resposta (SUZUKI et al, 2002; GARCIA-PEREZ et al, 2018; ORSTAVIK et al, 2006). O que determina a excitabilidade são a expressão, tráfego e status de fosforilação dos canais iônicos nos neurônios sensoriais (BENNETT e WOODS, 2014). Os neurônios responsáveis por detectar as lesões, conhecidos como nociceptores,

expressam canais de sódio independente de voltagem (VGSCs) para detectar estímulos prejudiciais (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010). Algumas subunidades α de VGSCs, como Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9, que contam com um grande número de nociceptores, são importantes na definição da excitabilidade e no potencial de ação em nociceptores (BLAIR e BEAN, 2002). Além disso, os canais dependentes de nucleotídeos cíclicos, os canais de potássio e os canais de Ca^{2+} do tipo T também estão relacionados com a regulação da excitabilidade (BLAIR e BEAN, 2002; FELDMAN et al, 2019). Dessa forma, a patogênese da dor neuropática está associada principalmente com três aspectos: a) as variações genéticas nos canais iônicos; b) alterações na expressão e tráfico desses canais iônicos; e c) modificações pós-traducionais (FELDMAN et al, 2017; FELDMAN et al, 2019).

Variantes genéticas nas VGSCs podem modular o risco de um indivíduo desenvolver a dor neuropática, como por exemplo as variantes do gene SCN9A (que codifica Nav1.7) que estão presentes em vários distúrbios de dor (DIB-HAJJ et al, 2013), incluindo pacientes com dor neuropática (LI et al, 2015; BLESNEAC et al, 2017). As variantes do gene SCN9A resultam em ganho de função do Nav1.7, um canal limiar importante na amplificação do sinal sensorial (FELDMAN et al, 2019). No que diz respeito a maior expressão dos canais iônicos, na dor neuropática há um aumento na expressão de Nav1.8, resultando em uma maior condução do impulso nervoso para o sistema nervoso central (SNC), promovendo dor neuropática (SUN et al, 2012). Além disso, existem ainda as modificações pós-traducionais específicas dos canais iônicos em decorrência do diabetes, condição que aumenta a expressão de metabólitos reativos, como o metilglioxal. Dentre outras funções, o metilglioxal pode modificar Nav1.8 pós-traducionalmente, resultando em hiperexcitabilidade dos neurônios sensoriais contribuindo para a dor (BIERHAUS et al, 2012).

A hiperexcitabilidade dos neurônios leva ao aumento das respostas aos estímulos e à atividade neuronal ectópica, levando a entrada nociceptiva excessiva na medula espinhal. Na medula espinhal, a microglia é ativada e aumenta ainda mais a excitabilidade no corno dorsal, processo conhecido como sensibilização central (WOOLF, 2011).

Mecanismos centrais da dor neuropática (sensibilização central) – No processo de sensibilização central há um aumento da transmissão sináptica na

medula espinhal, ampliando a sinalização nociceptiva (WOOLF, 2011). Esse é um processo em que há um somatório das entradas nociceptivas, fazendo com que os neurônios do corno dorsal tenham uma resposta aprimorada à essas sinalizações. Esses somatórios são decorrentes de alterações relacionadas aos neurônios da medula espinhal, às células da glia, ao processamento de informações no corno dorsal da medula espinhal e aos centros cerebrais superiores (FELDMAN et al, 2019).

Em relação aos neurônios da medula espinhal, estes apresentam hiperexcitabilidade aos estímulos periféricos, observados em modelos animais que apresentavam PND (TAN et al, 2012). Nas alterações na glia, a microglia (célula imunológica do SNC) se transforma em um fenótipo pró-inflamatório que pode liberar, por exemplo, fator neutrófico derivado do cérebro (BDNF) que amplifica a sinalização sináptica nociceptiva na medula espinhal e contribui para a hipersensibilidade à dor mecânica (SALTER e BEGGS, 2014). No corno dorsal da medula espinhal o processamento de informações nociceptivas é regulado por um sistema modulador da dor descendente que pode inibir ou facilitar a transmissão de informações nociceptivas na medula espinhal e é justamente o desequilíbrio entre a facilitação e inibição que irá colaborar para o desenvolvimento da dor neuropática (MARSHALL et al, 2017). Nos centros cerebrais, a conectividade reduzida entre o tálamo e o córtex, além de alterações estruturais, ocasionam danos nas vias somatossensoriais levando a um processamento aberrante da dor (CAUDA et al, 2009; SELVARAJAH et al, 2014).

É importante ressaltar que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor neuropática ainda carecem de estudos mais aprofundados, sendo que alguns desses mecanismos foram apenas avaliados em modelos animais. Além disso, existe a importância de estudos que diferenciem esses mecanismos da dor neuropática entre os tipos diferentes de diabetes, uma vez que o próprio mecanismo da doença é diferente.

4.3.1 Indução à dor neuropática em modelos animais

A indução à dor neuropática em modelos animais pode ser realizada através da indução ao diabetes, fazendo com que ocorra modificações persistentes nos nervos induzida por hiperglicemia. Um dos modelos utilizados é a indução através da injeção de estreptozocina (STZ) em ratos ou camundongos. A injeção

de STZ por via venosa é responsável por induzir o diabetes após o terceiro dia, devido à destruição das células beta. Os animais desenvolvem todos os distúrbios metabólicos causados pela hiperglicemia, sejam sensoriais ou motores (AKBARZADEH et al, 2007). De acordo com Redivo e colaboradores (2016) o pico da dor neuropática ocorre na quarta semana após a administração de STZ.

A discussão acadêmica e clínica da neuropatia diabética é geralmente centrada em seu componente sensorial, principalmente sobre a dor neuropática. Porém a neuropatia também causa impactos prejudiciais ao sistema motor e neuromuscular, que serão melhor elucidados no capítulo seguinte. Embora muitas farmacoterapias disponíveis (por exemplo, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes e analgésicos opióides) sejam utilizadas no tratamento da dor neuropática, esses medicamentos produzem efeitos colaterais (ZILLIOX e RUSSELL, 2011), fazendo com que haja uma baixa adesão por parte dos pacientes, sem falar na baixa responsividade do tratamento, uma vez que somente 1/3 dos pacientes apresentam 50% de alívio da dor (HUIZINGA e PELTIER, 2007). Além disso, a terapia com fármacos parece não trazer benefícios aos impactos sofridos ao sistema motor e neuromuscular.

4.4 ATROFIA MUSCULAR

Como visto anteriormente, as consequências da PND podem atingir não apenas as funções sensoriais mas também as motoras, provocando atrofia e fraqueza muscular (DYCK, ALBERTS e ANDERSEN, 2011; ALLEN et al, 2016). Embora os neurônios motores possam ser mais resistentes que os axônios sensoriais devido às disfunção e degeneração associada ao diabetes, estudos em modelos animais e humanos mostraram que o sistema motor é afetado (SAID et al, 2008; SOUAYAH et al., 2009; ALLEN et al., 2013). A PND impacta o sistema neuromuscular acelerando a perda dos axônios e unidades motoras (ALLEN et al, 2014; ALLEN et al, 2014; RAMJI et al, 2007), estando associada à atrofia muscular neurogênica (ANDERSEN et al, 2004; ANDREASSEN et al, 2006). Os neurônios motores são responsáveis por regular a massa e função muscular. Pacientes com desnervação causadas por doenças como a PND são forçados a entrar em ciclo vicioso de miopatia por desuso muscular crônico, que resultam em perda de massa magra, fraqueza e dor (TAMURA et al, 2015). A

perda de unidades motoras parece estar relacionada com a duração e gravidade da doença (ALLEN et al, 2016). Além disso, o diabetes, causado pela insuficiência de insulina, é uma condição catabólica que promove atrofia muscular devido à sua capacidade de interferir em diversos mecanismos de síntese e degradação proteica (BONALDO e SANDRI, 2012).

A atrofia muscular é definida como uma diminuição do tecido muscular devido ao encolhimento celular (BONALDO e SANDRI, 2012). Essa diminuição ocorre devido a um desequilíbrio entre as taxas de síntese e degradação de proteínas, no qual uma diminuição de síntese ou uma aceleração da degradação pode resultar em perda de massa magra (LECKER et al, 2006). Todas as proteínas intracelulares e algumas proteínas extracelulares estão continuamente sofrendo o processo de degradação, ou seja, estão sendo hidrolisadas em seus aminoácidos constituintes que serão sintetizadas novamente. Esse é um processo importante para manter a homeostase muscular. Os processos proteolíticos são altamente seletivos e são realizados por múltiplos sistemas e mecanismos reguladores complexos que, durante o seu funcionamento correto, evitam a quebra excessiva dos constituintes celulares (LECKER et al, 2006; MITCH e GOLDBERG, 1996).

A maioria das proteínas intracelulares é degradada pelo sistema ubiquitina(Ub)-proteassoma (UPP) (BONALDO e SANDRI, 2012; LECKER et al, 2006). A UPP é um sistema de degradação de proteínas mal formadas ou danificadas devido a alguma mutação, erros biossintéticos ou danos causados por espécies reativas de oxigênio. Este sistema promove um mecanismo de marcação e destruição de proteínas e age no músculo removendo proteínas sarcômicas após alterações na atividade muscular (BONALDO e SANDRI, 2012; LECKER et al, 2006). Em algumas condições catabólicas, como por exemplo na deficiência de insulina, existe uma degradação acelerada de proteínas musculares via UPP, causando perda de massa muscular (LECKER et al, 2006).

Já as proteínas extracelulares e algumas proteínas da superfície celular são absorvidas pela endocitose e degradada nos lisossomos pelo sistema autofagia-lisossomo (BONALDO e SANDRI, 2012; LECKER et al, 2006). Este sistema, assim como a UPP, é importante na renovação dos componentes celulares e além disso tem um papel duplo na homeostase muscular, podendo ser prejudicial e contribuir para a degeneração muscular, mas também podendo

ser um mecanismo compensatório para a sobrevivência celular (MIZUSHIMA et al, 2008; BONALDO e SANDRI, 2012). Os genes relacionados à autofagia (ATG) regulam o processo autofágico em todos os seus estágios (GOZUACIK et al, 2007). Na maioria das células esse processo é acelerado pela falta de insulina (LECKER et al, 2006). Durante a desnervação, a degradação lisossômica contribui para a quebra de proteínas musculares (FURUNO et al., 1990).

Além desses sistemas proteolíticos, existe uma rede complexa de vias de sinalização que coordenam a síntese e a degradação de proteínas de forma simultânea, regulando o tamanho das miofibras e o desempenho contrátil do músculo. Entre essas vias de sinalização, destaca-se a via da IGF1-Akt-FoxO (BONALDO e SANDRI, 2012).

O fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF1), é um fator de crescimento circulante, também produzido localmente por muitos tecidos, incluindo o músculo esquelético. De forma geral o IGF1 tem o papel de ativação da via Akt, essa via é responsável pela inibição da degradação de proteínas, fosforilando os fatores de transcrição da família FoxO (BONALDO e SANDRI, 2012; SCHIAFFINO e MAMMUCARI, 2011), além de estimular a síntese de proteínas, ativando indiretamente a via mTOR. A mTOR faz parte de dois complexos distintos, o TORC1 sensível a rapamicida, que contém Raptor, e o TORC2 insensível a rapamicida que contém Rictor. O TORC2 é responsável pela fosforilação e ativação da via Akt, enquanto o TORC1 age estimulando a síntese de proteínas e inibindo genes autofágicos ATG que promovem degradação de proteínas (revisado em LAPLANTE e SABATINI, 2012).

Todos esses mecanismos envolvidos no processo de síntese e degradação de proteínas estão sujeitos à interferências no seu funcionamento durante situações catabólicas, tanto metabólicas como é o caso do diabetes, como neurodegenerativas, como é o caso da PND.

A prescrição de exercício físico, em especial o treinamento de força, tem sido utilizada como uma forma de intervenção efetiva contra os processos de atrofia muscular, sendo capaz de manter e melhorar a função do sistema músculo esquelético (ALLEN et al, 2016). Porém, o exercício físico pode não ter adesão em pacientes com neuropatia mais avançada, em que os casos de ulceração nos pés são mais comuns (FELDMAN et al, 2019). Sendo assim, faz-se necessário a utilização de terapias alternativas que tratem de forma global os

impactos da neuropatia e que gerem adesão de indivíduos com doenças crônicas que não desejam ou não podem participar dos regimes tradicionais de treinamento.

4.5 AQUECIMENTO PASSIVO

O aquecimento passivo tem propriedades miméticas ao exercício físico, sendo capaz de gerar respostas fisiológicas parecidas ao exercício na força e massa muscular (RODRIGUES et al, 2020). De fato, o uso do aquecimento passivo em casos de atrofia muscular vem sendo amplamente estudado, seja essa atrofia por desuso (NAITO et al, 2005) ou desnervação (TAMURA et al, 2015; OHIRA et al, 2017), e tem mostrado resultados bastante positivos. Dessa forma, esse método poderia representar uma boa alternativa para diabéticos que sofrem com a atrofia muscular, condição que pode ser agravada pelo quadro de neuropatia, como visto nos tópicos anteriores.

O aquecimento passivo pode ser realizado através de diversas formas e com equipamentos variados, como por exemplo diatermia por micro-ondas, câmaras ambientais, placas geradoras de calor e vapor, compressas térmicas e imersão em água quente, sendo a imersão em água quente um dos métodos mais acessíveis com maior aplicabilidade prática (MCGORM et al, 2018). Estudos tem mostrado resultados benéficos independentemente do método utilizado, conforme descrito na tabela 1, demonstrando que a temperatura muscular é o fator-chave para os efeitos do aquecimento (GOTO et al, 2005; GOTO et al, 2011; GOTO et al, 2015). É importante ressaltar que a temperatura muscular aumenta de forma diferente para cada método de aquecimento. Em modelos animais, a temperatura muscular atinge 41°C logo após os primeiros 10 minutos de imersão em água a 42°C (SCHIBAGUCHI et al, 2016).

O aumento do estresse térmico, após a exposição ao calor, é responsável por induzir uma série de ajustes hemodinâmicos e metabólicos, além de ativar as principais vias de sinalização responsáveis pelo remodelamento do músculo esquelético, gerando aumento da expressão de proteínas como HSP70, hipertrofia e força muscular (MCGORM et al, 2018; KIM et al, 2020). Além disso, estudos tem demonstrado que o estresse térmico gerado pelo aquecimento passivo é responsável por ativar eventos moleculares específicos que causam alterações na expressão gênica, efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes,

antinociceptivos, promovem biogênese mitocondrial e atuam no metabolismo da glicose (MCGORM et al, 2018; KIM et al, 2020). Neste tópico da revisão serão abordados os principais efeitos nas adaptações musculares e na dor.

TABELA 1. Resumo dos estudos com utilização do aquecimento passivo nas adaptações musculares em modelos animais

Referência	Método de aquecimento	Protocolo de intervenção	Principais achados
Naito et al. (2000)	Câmara ambiental. A temperatura foi mantida à 41°C por 60 minutos.	ET foi realizado antes de uma Atenuação da perda de massa imobilização dos membros muscular acompanhada por um aumento na expressão da HSP70 inferiores que durou 8 dias.	
Uehara et al. (2004)	Câmara ambiental. A temperatura foi mantida à 41°C por 60 minutos.	ET realizado pré remoção do músculo sóleo, que foi removido 1, 7 e 14 dias após a TC.	Maior massa muscular comparada ao peso total e aumento de proliferação de p70s6K comparado ao grupo controle O grupo tratado teve menor perda de massa muscular comparado ao grupo controle. O conteúdo de proteína muscular foi maior no grupo que realizou ET.
Naito et al. (2005)	Câmara ambiental. A temperatura foi mantida à 41°C por 60 minutos.	ET realizado pré imobilização da pata traseira	
Selsby e Dodd (2005)	Cobertor térmico. A temperatura do core foi mantida à 41-41,5°C por 30 minutos	ET foi realizado 24h após a imobilização das patas traseiras que durou 8 dias. O ET foi realizada em dias alternados até o fim da imobilização.	Menor atrofia muscular comparado ao grupo controle

Continua

Continuação

Referência	Método de aquecimento	Protocolo de intervenção	Principais achados
Ohno et al. (2010)	Câmara ambiental. A temperatura foi mantida à 42°C por 60 minutos.	ET realizado pré dissecação do músculo sóleo realizada 1, 3 e 7 dias após o estresse térmico.	Aumento de massa muscular hidratada e na expressão de HSP72 observado 7 dias após o ET.
Touchberry et al. (2012)	Imersão em água quente. Temperatura da água foi mantida à 43°C e a temperatura do core mantida à 41-41,5°C por 20 minutos	ET pré-lesão induzida por exercício.	Aumento do conteúdo de proteína muscular 48 horas após o tratamento
Takeushi et al. (2014)	Imersão em água quente. A temperatura da água foi mantida à 42°C por 20 minutos	ET realizado 5 minutos após a indução de lesão muscular por esmagamento.	O grupo tratado apresentou maior quantidade e tamanho das fibras musculares comparados ao controle.
Morimoto et al. (2015)	Imersão em água quente. Temperatura da água foi mantida à 42°C por 60 minutos.	ET foi realizado uma vez a cada 3 dias durante a administração de dexametasona (injetada durante 6 dias/semanas durante 2 semanas)	Atenuação na diminuição do diâmetro muscular e supressão dos genes associados à atrofia muscular comparados ao grupo controle.
			Continua

Continuação

Referência	Método de aquecimento	Protocolo de intervenção	Principais achados
Tamura et al. (2015)	Câmara ambiental. A temperatura foi mantida à 40°C por 60 minutos	ET realizado do dia 3 ao dia 9 durante 10 dias de desnervação induzida por remoção do nervo ciático.	Atenuação da atrofia muscular nos músculos desnervados comparados ao grupo controle.
Shibaguchi et al. (2016)	Imersão em água quente. A temperatura da água foi mantida à 42°C por 30 minutos.	ET realizado 2 dias após indução de lesão muscular através de injeção de bupivacaina. O ET foi repetido por 14 dias após o primeiro tratamento.	Aumentou a recuperação do peso muscular relativo ao peso total, aumento das fibras musculares e expressão de HSP72
Ohira et al. (2017)	Imersão em água quente. A temperatura da água foi mantida à 42°C por 30 minutos	Foram realizadas 7 sessões de ET após desnervação muscular de forma intermitente (uma sessão de tratamento a cada dois dias).	Atenuação da atrofia muscular nos músculos desnervados tratados com ET. inervados tratados com ET.

Fonte: A Autora (2021).

Legenda: ET (Estresse térmico)

4.5.1 Efeitos do aquecimento passivo na dor neuropática e a modulação da proteína chaperona HSP70

Os efeitos fisiológicos do aquecimento passivo incluem o alívio da dor, mas geralmente os estudos são voltados para as dores relacionadas à lesões musculares, não havendo até o momento estudos com aquecimento passivo em dor neuropática. Sabe-se que o exercício físico pode induzir alguns efeitos de atenuação e atraso no aparecimento da dor neuropática, como visto no estudo de Chen e colaboradores (2013), que associaram esses efeitos na dor neuropática ao aumento na expressão da HSP72 nos nervos periféricos e medula espinhal. As HSPs aumentam sua expressão em resposta a diversos estressores, entre eles o estresse térmico (HUNT et al, 2020).

As HSPs são classificadas numericamente pelo seu peso molecular – de HSP10 com 10kDa até HSP110 com 110 kDa (MCGORM et al, 2018) e desempenham diversos papéis funcionais, incluindo proteção celular, prevenção de desnaturação e agregação de proteínas celular (NOBEL et al, 2004), proteção celular de estressores, sinalização celular (MORTON et al, 2001), e manutenção da homeostase celular (MCGORM et al, 2018). Essas proteínas podem desempenhar funções específicas no combate ao surgimento e progressão de algumas condições médicas como por exemplo, prevenir o desenvolvimento de resistência à insulina, distrofia muscular (THANKUR et al, 2003), atenuação da dor neuropática (CHEN et al, 2013) e melhora na PND (MA et al, 2014).

Uma categoria específica das HSPs, a HSP70, tem sido bastante discutida na literatura devido aos seus efeitos neuroprotetivos. Esses efeitos são principalmente atribuídos às suas funções como proteínas chaperonas, que auxiliam as proteínas no seu processo de enovelamento, garantindo que elas alcancem a estrutura espacial correta. Dessa forma a Hsp70 pode ajudar a remodelar proteínas mal formadas, prevenir interações inadequadas de proteínas, gerenciar a formação de agregados de proteínas e direcionar a degradação de proteínas danificadas ou disfuncionais. É importante ressaltar que a eficácia da modulação da HSP70 não se limita à doenças neurodegenerativas induzidas pela formação de agregados de proteínas. A Hsp70 também demonstrou diminuir a sinalização inflamatória, diminuir o estresse oxidativo e melhorar a função mitocondrial em PND e outras condições cuja etiologia não está ligada à formação de agregados de proteínas (EMERY e

DOBROWSKI, 2016; ZHANG et al, 2017; KIM et al, 2020). Estudos recentes tem demonstrado que além do papel importante como chaperona, as HSPs podem ter efeitos neuroprotetivos devido à sua interação com proteínas relacionadas à morte celular (apoptose) e vias inflamatórias (revisado em KIM et al, 2020).

Um dos mecanismos pelos quais a HSP70 influencia na apoptose é pela inibição da ativação das caspases, que ocorre por diversas vias diferentes. Além disso, as HSP70 também inibem a via de apoptose independente de caspase através da inibição da via AIF (fator de inibição à apoptose). As HSP70 também estão associadas à diminuição na produção de ROS e ao aumento na atividade da enzima antioxidante mitocondrial, fatores que são responsáveis pela lesão neuronal nas neuropatias (revisado em KIM et al, 2020). Outro mecanismo importante da HSP70 está relacionado com a inibição da via c-Jun-N-terminal kinase (JNK), protegendo neurônios da apoptose (LEE et al, 2005), e também pela diminuição na expressão da c-Jun, responsável por dano neuronal e desmielinização das células de Schwann (ZHANG et al, 2017). A c-Jun é expressada de forma mínima em neurônios saudáveis, mas sua expressão começa a ser rapidamente aumentada em patologias ou danos que afetem os neurônios. O estudo de Zhang e colaboradores (2017) demonstrou que a modulação de proteínas chaperonas, como as HSP70, podem antagonizar a expressão de c-Jun e a subsequentes desmielinização nas células Schwann da GRD (ganglia da raiz dorsal). Sendo assim, tratamentos que antagonizam a expressão da c-Jun podem ser uma estratégia para tratar certas neuropatias humanas.

As HSP70 também são responsáveis por regular as vias inflamatórias. Porém, efeitos opostos são esperados da HSP70 intracelular (HSP70i) ou extracelular (HSP70e). Estudos tem demonstrado que as HSP70i inibem respostas celulares à citocinas inflamatórias como TNF- α e interleucina (IL)-1, diminuem a secreção de TNF- α , a produção de ROS e a ativação de NF- κ B (fator de transcrição que serve de gatilho para inflamação) (revisado em KIM et al, 2020). Já a HSP70e está associada com a ativação do sistema imunológico/inflamatório e tem sido hipotetizado que ela funciona como um sinal de aviso para que o sistema imunológico combata infecções existentes (revisado em EMERY e DOBROWSKI, 2016).

Considerando todos os mecanismos que demonstram o caráter neuroprotetivo das HSP70, e que o aumento da expressão dessa proteína é uma das respostas esperadas do aquecimento passivo, justifica-se a utilização desse método como uma possível estratégia no tratamento da dor neuropática.

4.5.2 Efeitos do aquecimento passivo nas adaptações musculares

Os principais efeitos do aquecimento passivo nas adaptações musculares em modelos animais estão descritos na tabela 1, além das respostas encontradas na atenuação da atrofia e hipertrofia muscular e aumento da expressão de algumas proteínas, o aumento da força muscular também é um efeito do aquecimento passivo mas que foi observado apenas em modelos humanos (NOSAKA et al 2004; SAGA et al, 2008; SKURVYDAS et al, 2008; VAILE et al, 2008). Sendo que, de acordo com diversos estudos, o principal mecanismo pelos quais essas adaptações musculares podem ocorrer parece estar relacionado com o aumento da expressão das HSPs.

O aumento da expressão da HSP70 parece estar relacionado com a atenuação da atrofia e hipertrofia muscular. O trabalho pioneiro de Naito e colaboradores (2000) revelou que o estresse térmico é capaz de atenuar a atrofia muscular causada por desuso. Os autores relacionaram os efeitos com uma regulação positiva da proteína HSP70, capaz de proteger contra a redução da síntese proteica.

Além de diminuir a atrofia muscular, o aquecimento passivo parece ser também um tratamento importante para induzir hipertrofia em músculos saudáveis (KOBAYASHI et al, 2015; OHNO et al, 2015; UEHARA et al, 2004). As mudanças na hipertrofia muscular são notadas tanto em intervenções agudas (TAKEUCHI et al; 2014; KOBAYASHI et al, 2015; UEHARA et al, 2004) como crônicas (OHIRA et al, 2017; SELSBY et al, 2007), mas a resposta é dependente da temperatura, tempo e frequência de exposição ao tratamento (GOTO et al, 2005). Como visto no tópico anterior sobre as vias relacionadas à atrofia muscular, pudemos perceber que a mTOR é uma via importante que se divide em dois complexos, no qual a mTORC1 desempenha papel essencial na síntese de proteínas e inibição dos genes autofágicos. Estudos tem demonstrado que o estresse térmico tem interferência na ativação da mTORC1. Uehara e colaboradores (2004) demonstraram que após o aquecimento passivo, a

hipertrofia causada do músculo sóleo foi precedida pelo aumento da fosforilação de p70s6k Thr389, que é indicativo de atividade aumentada da mTORC1. Esse estudo foi corroborado por diversos outros realizados em modelos animais (OHNO et al, 2015; TAMURA et al, 2014; YOSHIHARA et al, 2013), demonstrando que a ativação da mTORC1 é uma resposta esperada do aquecimento passivo, sendo um mecanismo que pode estar relacionado com a resposta hipertrófica. Além disso, estudos encontraram uma conexão entre as respostas da mTOR e a expressão da HSP, quando não há ativação da via mTOR a expressão da HSP é prejudicada devido a inibição da fosforilação do fator de transcrição 1 da *heat shock* (HSP1) (CHOU et al, 2012).

Além disso, o aquecimento passivo pode influenciar na regulação da massa muscular suprimindo a degradação de proteínas e a depuração mitocondrial. Yoshihara e colaboradores (2015) relataram que a exposição crônica de 7 dias ao calor reduziu a autólise de calpaína e a ubiquitinação e proteínas miofibrilares e atenuou a atrofia em ratos. Em outro estudo com imersão em água quente por 7 dias após desnervação em ratos, ocorreu a redução de expressão de atrogina-1, uma ligase ubiquitina específica do músculo que se expressa durante a atrofia muscular (OHIRA et al, 2017). Resultados parecidos foram percebidos no estudo de Tamura e colaboradores (2015) com desnervação induzida, no qual o aquecimento passivo suprimiu a depuração mitocondrial causada por autofagia. Esses estudos tem demonstrado que o aquecimento passivo pode ser uma estratégia prática para combater os efeitos prejudiciais causados por desuso e desnervação do músculo esquelético, condições essas que estão presentes em pacientes com neuropatia diabética.

Além dos efeitos observados em relação à hipertrofia muscular, alguns estudos em humanos demonstraram que o aquecimento passivo é responsável pela melhora da função muscular através do ganho de força demonstrado através do aumento na força de contração voluntária máxima (GOTO et al, 2011; RACINAIS et al, 2017; KIM et al, 2020; PAULAUSKAS et al, 2020; RODRIGUES et al, 2021) aumento ou atenuação na perda de amplitude de movimento (NOSAKA et al, 2004, RACINAIS et al, 2017) e ganho ou atenuação na perda de potência muscular (SKURVYDAS et al, 2008). Os efeitos do aquecimento passivo na força em modelos animais parece não ter sido ainda testada.

De forma geral fica evidente que o aquecimento passivo é uma área de investigação promissora, uma vez que tem apresentado resultados positivos em diversos aspectos metabólicos, físicos e fisiológicos. Sendo assim, o aquecimento passivo deveria ser testado como uma proposta alternativa no tratamento de doenças e condições neurodegenerativas como a neuropatia diabética e suas complicações.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 71 ratos *Wistar*, com 6 semanas de idade, provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos sob ambiente controlado de temperatura e ciclo claro/escuro, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram aprovados e conduzidos em acordo com as normas e legislações estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR (nº 1396).

5.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos randomicamente, através do website Research Randomizer, em 8 grupos (n=8-10 cada), conforme descrito a seguir:

Grupo 1 - Ratos diabéticos que realizaram o tratamento de imersão em água quente por duas semanas (diabéticos + tratamento + 2 semanas = DTI2) (n=8);

Grupo 2 - Ratos diabéticos que realizaram o tratamento de imersão em água quente por quatro semanas (diabéticos + tratamento + 4 semanas = DTI4) (n=10);

Grupo 3 - Ratos diabéticos que realizaram imersão em água termo neutra por duas semanas (diabéticos + controle + 2 semanas = DC2) (n=8);

Grupo 4 - Ratos diabéticos que realizaram imersão em água termo neutra por quatro semanas (diabéticos + controle + 4 semanas = DC4) (n=9);

Grupo 5 - Ratos normoglicêmicos que realizaram o tratamento de imersão em água quente por duas semanas (normoglicêmicos + tratamento + 2 semanas = NTI2) (n=9);

Grupo 6 - Ratos normoglicêmicos que realizaram o tratamento de imersão em água quente por quatro semanas (normoglicêmicos + tratamento + 4 semanas = NTI4) (n=9);

Grupo 7 - Ratos normoglicêmicos que realizaram a imersão em água termo neutra por duas semanas (normoglicêmicos + controle + 2 semanas = NC2) (n=9);

Grupo 8 - Ratos normoglicêmicos que realizaram a imersão em água termo neutra por quatro semanas (normoglicêmico + controle + 4 semanas = NC4) (n=9);

Dois animais foram excluídos no grupo DTI2 e um animal foi excluído no grupo DC2 por apresentarem níveis de glicose sanguínea inferiores à 250mg/dL 3 dias após a injeção de STZ.

A opção de não usar grupos com insulina foi para ampliar os achados provocados pelo diabetes.

FIGURA 1. DESENHO EXPERIMENTAL 1

GRUPOS	DIA -2	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
DTI2 (n=8)						
DC2 (n=8)						
DTI4 (n=10)						
DC4 (n=9)						
NTI2 (n=9)						
NC2 (n=9)						
NTI4 (n=9)						
NC4 (n=9)						

Legenda			
	Indução ao diabetes		Imersão em água quente
	Imersão em água termo neutra		Eutanásia

Fonte: A Autora (2021).

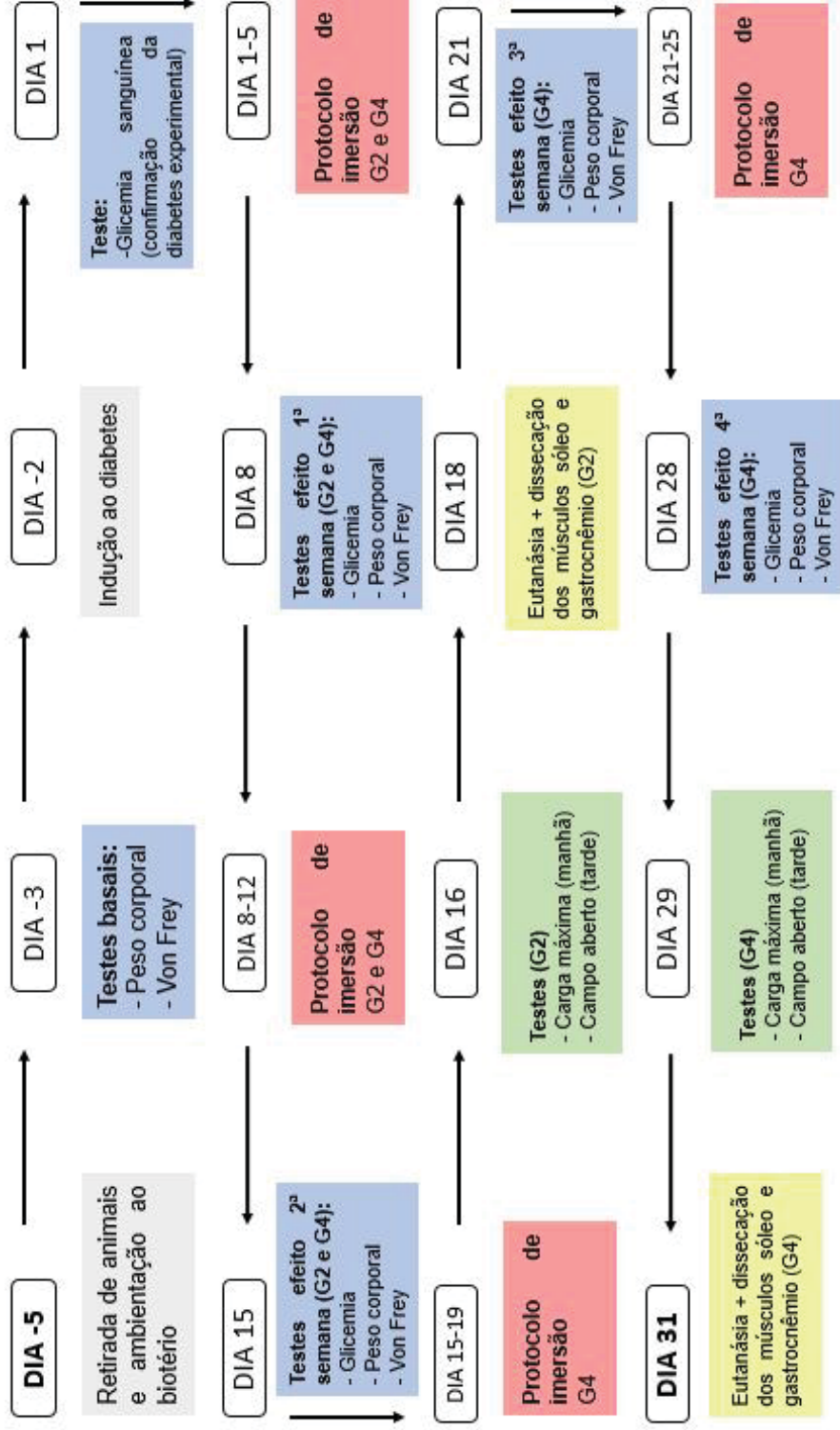
Legenda: DTI (grupo diabético com treinamento de imersão em água quente), D (grupo diabético com imersão água termo neutra), NTI (grupo normoglicêmico com treinamento em imersão de água quente) e N (grupo normoglicêmico com imersão em água termo neutra).

As imersões foram realizadas 5 vezes na semana durante 30 minutos cada sessão. Após 2 semanas de tratamento, os grupos DTI2, DC2, NTI2 e NC2 foram avaliados, enquanto o restante permaneceu realizando o tratamento por mais duas semanas.

Cinco dias antes do início do tratamento com aquecimento passivo os animais eram retirados para ambientação ao biotério. Após dois dias, eram realizados os testes basais de peso corporal e alodinia mecânica. No dia seguinte e 2 dias antes do início do tratamento, era realizado a divisão dos grupos e indução ao diabetes para os animais dos grupos DTI e DC. Três dia

após a indução, o diabetes era confirmado através do teste de glicemia sanguínea. No mesmo dia, o protocolo de imersão era iniciado. As imersões ocorriam durante 5 dias seguidos com pausa de 2 dias, cada imersão teve a duração de 30 minutos, totalizando 150 minutos semanais. Os testes de glicemia, alodinia mecânica e peso corporal eram realizados semanalmente a fim de avaliar os efeitos do tratamento/controle semana à semana. Os grupos DTI2, DC2, NTI2 e NC2 realizavam o tratamento apenas por duas semanas. Para esses grupos, na terceira semana eram realizados os testes de carga máxima para análise da força muscular e campo aberto para atividade locomotora. Em seguida, os animais eram eutanasiados, previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de sódio pentobarbital (50 mg/kg). Os músculos sóleo e gastrocnêmio foram removidos cirurgicamente de ambos membros inferiores de cada animal. O excesso de gordura e tecido conjuntivo foi retirado. O músculo sóleo e gastrocnêmio foram pesados. Os animais dos grupos DTI4, DC4, NTI4 e NC4 continuavam com os protocolos de imersão por mais duas semanas. Na quinta semana realizavam os mesmos testes de campo aberto, carga máxima e dissecação muscular (Figura 2).

FIGURA 1. DESENHO EXPERIMENTAL 2



FONTE: A Autora (2021)

Legenda: G2 (Todos os grupos avaliados durante duas semanas. DT12; DC2; NT12; NC2); G4 (Todos os grupos avaliados durante quatro semanas, DT14, DC4, NT14, NC4).

5.3 INDUÇÃO AO DIABETES EXPERIMENTAL

O diabetes foi induzido experimentalmente através de uma injeção única, via intraperitoneal (i.p.), de 60 mg/Kg de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, diluída em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5) em ratos submetidos previamente a jejum de 12 horas. O diabetes foi confirmado três dias após a injeção de STZ. Para isso, amostras de aproximadamente 5 µl de sangue da veia caudal foram adicionadas a fitas teste impregnadas de glicose oxidase (Accu-Check Active™, Roche) e analisadas através do glicosímetro digital (Accu-Check Active™, Roche). Somente animais com glicemia igual ou superior a 250 mg/dL no início (3 dias após a administração de STZ) do experimento foram incluídos no estudo. Ratos normoglicêmicos, que receberam apenas o veículo (tampão citrato), foram usados como controle.

5.4 PROTOCOLO DE AQUECIMENTO PASSIVO

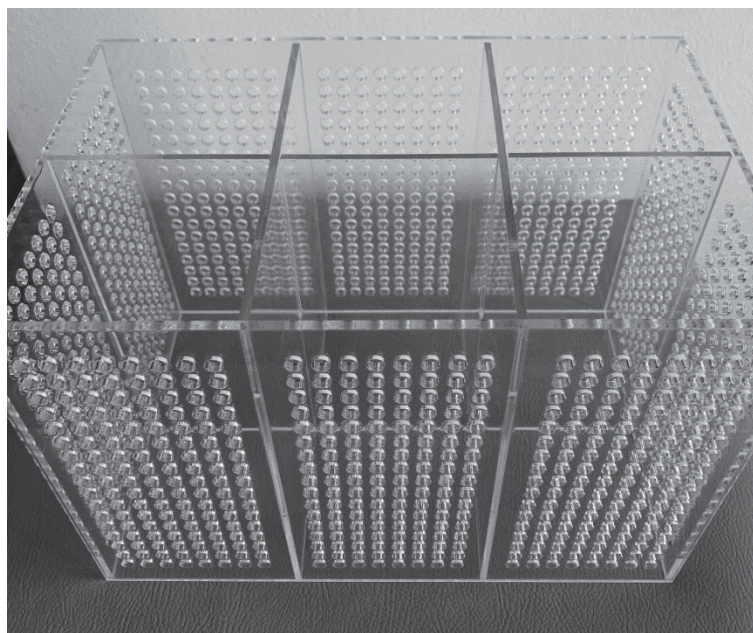
O protocolo de aquecimento passivo neste estudo foi realizado através de imersão em água quente. Para os grupos experimentais (DTI e NTI) a temperatura da água foi mantida em ~42 °C conforme descrito em estudos prévios (SHIBAGUCHI et al, 2016; MORIMOTO et al, 2015; OISHI et al, 2015). Os grupos controle (DC e NC) realizaram imersões em água termo neutras à 34°C (ROWSELL et al, 2009).

O protocolo de imersão ocorreu em dois momentos distintos. Inicialmente os animais eram alocados durante 10 minutos em uma caixa com água termo neutra (34°C) para a ambientação ao meio aquático. Conforme observado em projeto piloto, os dez primeiros minutos eram os momentos em que os animais mais defecavam, comportamento esperado quando os animais são colocados em um ambiente novo. Sendo assim, foi percebida a necessidade de fazer uma ambientação antes do protocolo de estresse térmico. Após os 10 minutos iniciais, seis animais por vez eram trocados de caixa e alocados em um aparato confeccionado em acrílico com dimensões de 8x8x16cm, conforme demonstrado na figura 3. Animais dos grupos DTI e NTI eram alocados no mesmo aparato, assim como os animais do grupo DC e NC.

Os procedimentos experimentais ocorreram nos meses de fevereiro, março, abril e maio. Os 71 animais não foram avaliados no mesmo período de tempo. Foram divididos em 3 grupos. No primeiro grupo foram avaliados 26 animais, no

segundo grupo foram avaliados 17 animais e no terceiro grupo foram avaliados 28 animais. Nos 3 momentos haviam animais correspondentes aos 8 grupos experimentais. Sendo assim a quantidade de sessões diárias para realizar o protocolo em todos os animais variavam de acordo com a quantidade de animais entre os 3 grupos. Para o último grupo, por exemplo, eram realizadas entre 5 e 6 sessões por dia nas duas primeiras semanas. Todos os animais utilizavam a mesma banheira e o mesmo aparato, porém a água era sempre trocada.

FIGURA 3. CAIXA DE ACRÍLICO UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE AQUECIMENTO PASSIVO



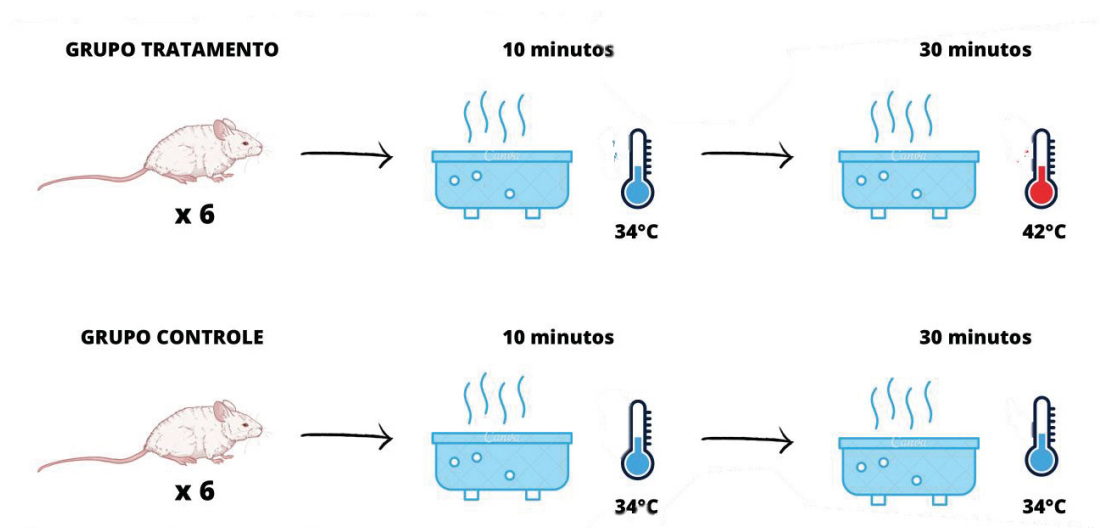
FONTE: A Autora (2021)

Esse aparato fazia com que os animais permanecessem apoiados apenas nas patas traseiras, o que facilitava a imersão apenas nos membros inferiores. Após serem alocados nesse aparato, água quente (42°C) ou termo neutra (34°C) era adicionada à caixa, a água era previamente aquecida através de uma chaleira elétrica. Neste momento era realizado um controle da temperatura da água, pois no momento que a água era transferida para a caixa, a temperatura diminuía para 41°C, nesse momento, mais água quente era adicionada para atingir os 42°C. A água adicionada cobria uma altura de 5cm na caixa, esse volume foi estabelecido por ser a quantidade suficiente de água para cobrir apenas os membros inferiores dos animais. A temperatura da água era então mantida, pelos próximos 30 minutos, à 42°C para os grupos em tratamento e à 34°C para os grupos controle (Figura 4), com a utilização de um aquecedor de

100W específico para aquários e mensurada por um termômetro alocado na caixa externa conforme demonstrado na figura 5. O aquecedor não conseguia manter a temperatura da água à 42°C, sendo assim quando necessário, água quente, aquecida através de uma chaleira elétrica, era adicionada à banheira ao mesmo tempo que era realizado o controle de volume de água na caixa.

Para garantir que a temperatura da água fosse igual em toda a caixa, a água era agitada frequentemente e a mensuração da temperatura feita em pontos diferentes da caixa, uma vez que havia a tendência da água estar mais aquecida perto do aquecedor.

FIGURA 4. PROTOCOLO DE IMERSÃO EM ÁGUA QUENTE EM MODELOS ANIMAIS – I



FONTE: A Autora (2021)

FIGURA 5. PROTOCOLO DE IMERSÃO EM ÁGUA QUENTE EM MODELOS ANIMAIS - II



FONTE: A Autora (2021)

A aferição de temperatura retal aconteceu semanalmente, sempre no quarto dia da semana, a fim de confirmar o efeito do tratamento sobre a temperatura do core. As aferições foram realizadas antes do início do tratamento (-10'), após os 10 minutos de ambientação (0'), e a cada 10 minutos após a imersão (10', 20', 30'), seja em água quente ou termo neutra, através de um termômetro retal (YSI Precision™ 4000A Thermometer). Sendo assim, essas avaliações aconteciam em cinco momentos diferentes (-10', 0', 10', 20', 30'). Para cada momento, era escolhido de forma randômica, um animal para aferição da temperatura. Para os grupos em tratamento, a temperatura do core foi mantida em $\sim 41^{\circ}\text{C}$ (SHIBAGUCHI et al, 2016). As médias das temperaturas obtidas, tanto para o grupo tratamento quanto para o grupo controle, estarão descritas no capítulo de resultados.

5.5 TESTE DE ALODINIA MECÂNICA

A resposta ao estímulo mecânico, para análise de dor neuropática, foi avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata de ratos (Von Frey eletrônico), mensurado por um analgesímetro eletrônico (INSIGHT Ltda,

Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O aparelho possui um transdutor de força conectado a um contador digital no qual a força aplicada é expressa em gramas (g). O contato do transdutor de força com a pata é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico para ambientação por 15 min. Após a ambientação, foi aplicada uma força linearmente crescente no centro da região plantar das patas traseiras do animal. O estímulo era cessado quando o animal produzia uma resposta de retirada e sacudida da pata estimulada (Figura 6). A intensidade da alodinia mecânica foi, então, quantificada e expressa como a média dos três valores obtidos em cada pata (YAMAMOTO et al., 2009). Esse teste foi realizado antes do início do protocolo de estresse térmico e semanalmente, sempre no primeiro dia de protocolo, conforme descrito anteriormente na figura 1.

FIGURA 6. TESTE DE VON FREY



FONTE: Moraes et al. (2016)

5.6 TESTE DE CAMPO ABERTO

A atividade locomotora foi medida através do teste de campo aberto (SANTIAGO et al, 2010. Para tanto, foi utilizada uma caixa retangular (40 x 50 x 63cm), com o piso dividido em 9 unidades quadrangulares (Figura 6). Os animais eram alocados no quadrado central do campo aberto e poderiam explorar livremente o espaço por 5 minutos. O número de vezes que os animais cruzaram de um quadrado para o outro foi quantificado para obter a frequência de locomoção.

FIGURA 7. TESTE CAMPO ABERTO



Fonte: A Autora (2021)

5.7 TESTE DE CARGA MÁXIMA

Para a determinação da carga máxima, os animais subiram uma escada (1,1 x 0,18 m, 2 cm de grade e inclinação de 80°) com um aparato de peso preso à cauda (Figura 7). No topo da escada havia uma caixa (20x20x20) para descanso entre as tentativas. Após uma ambientação, que consistiu em subir a escada duas vezes sem a carga, cada animal iniciou o teste carregando uma carga referente à 75% do seu peso corporal. Após completar a subida, eram adicionadas cargas de 30g até o momento em que o animal não conseguia subir toda a extensão da escada. Os animais tinham um intervalo de 2 minutos de descanso entre as tentativas, inclusive durante a ambientação (HORNBERGER e FARRAR, 2004). A carga máxima considerada foi aquela que o animal carregou na última subida completa na escada. Para determinar a força máxima, a carga máxima foi dividida pelo peso de cada animal e multiplicada por 100. Os valores obtidos foram expressos em porcentagens.

FIGURA 8. TESTE DE CARGA MÁXIMA



FONTE: A Autora (2021)

5.8 MASSA MUSCULAR

O peso muscular foi determinado imediatamente após a dissecação. Foram dissecados o músculo sóleo e gastrocnêmio, de ambos os membros, e pesados através de uma balança de precisão (Shimadzu AY220). Os valores de peso muscular, para cada músculo avaliado, estão relacionados ao peso corporal. O peso muscular foi dividido pelo peso corporal e multiplicado por 100. Os valores foram representados em porcentagens.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do estudo estão apresentados em média e desvio padrão (média $\pm$ DP). A normalidade dos dados foi averiguada através do teste de Shapiro-Wilk. Quando confirmada, uma análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) de uma via foi realizada para verificar o efeito entre os grupos experimentais (tratamento vs. controle) e as condições (diabéticos vs. normoglicêmicos) para força muscular, massa muscular e atividade locomotora. Uma ANOVA de três vias foi utilizada para verificar a diferença entre os tempos de coleta (basal, 1, 2, 3 e 4 semanas), os grupos experimentais (tratamento vs. controle) e as condições (diabéticos vs. normoglicêmicos) para os desfechos de dor neuropática, peso e glicemia. Uma ANOVA de três vias foi utilizada para verificar a diferença entre os grupos experimentais (tratamento vs. controle) entre os momentos de coleta (-10', 0', 10', 20', 30') ao longo das semanas (1, 2, 3 e 4) para o desfecho de temperatura do core. Caso a esfericidade fosse violada pelo teste Mauchly o ajuste de Greenhouse-Geisser foi assumido para os graus de liberdade. O *post-hoc* de Bonferroni foi utilizado para identificar as diferenças. Para ANOVA, o η^2 parcial quadrado foi calculado considerando o efeito pequeno ($\eta_p^2 < 0.06$), médio ($0.06 \leq \eta_p^2 < 0.15$) e grande ($\eta_p^2 \geq 0.15$) (Cohen 1988; Bakeman 2005). Em toda a análise o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$ e o software utilizado será o IBM® SPSS® Statistics, versão 20.0 (Nova Iorque, Estados Unidos). Para a construção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 7.00 (San Diego, Califórnia).

7 RESULTADOS

Os resultados do efeito do aquecimento passivo para cada desfecho avaliado estão descritos abaixo.

7.1 TEMPERATURA DO CORE

As médias das temperaturas obtidas durante o estresse térmico estão descritas na tabela 2. Houve um efeito principal do grupo e dos momentos ($F_{(1,4)}=2335,05$; $p=0,01$; $\eta_p^2= 0,99$; $F_{(4,16)}=255,98$; $p=0,01$; $\eta_p^2= 0,98$; respectivamente) e houve uma interação entre grupo vs. momento ($F_{(1,4)}=192,57$; $p=0,01$; $\eta_p^2= 0,98$). Esses resultados demonstram que a média de temperatura ao longo do tratamento foi maior para os grupos tratados que para o controle e que esse aumento ocorreu nos momentos 10', 20', 30' ($p<0,01$), momentos em que o estresse térmico era iniciado, demonstrando que: *i*) Os momentos pré ambientação e pós ambientação não representaram ganhos significativos no aumento de temperatura corporal no grupo em tratamento; *ii*) A imersão em água termo neutra não representou ganhos significativos no aumento de temperatura corporal ao longo de todo o protocolo de imersão; *iii*) O protocolo de imersão em água quente (42°C) foi responsável por gerar um aumento significativo na temperatura corporal.

Não houve interação entre grupo vs. momento vs. semana ($F_{(12,48)}=0,47$; $p=0,92$; $\eta_p^2= 0,11$). Demonstrando que, tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratamento, não houve diferença da temperatura corporal, independente dos momentos, ao longo das semanas. Se tratando apenas do grupo tratamento, isso significa que não foi possível perceber um efeito de aclimação na temperatura do core. A água quente (42°C) foi responsável por gerar as mesmas alterações de temperatura desde a semana 1 até a semana 4, como não houveram variações significativas nas semanas, a tabela de resultados apresenta as médias obtida ao longo das semanas.

TABELA 2. Temperatura do core (média±DP) durante protocolo de imersão em água quente (tratados) ou termo neutra (controle)

Temperatura do core (°C)					
Grupos	Pré-ambientação	Após ambientação	Após 10'	Após 20'	Após 30'
Controle	37,55 ± 0,43	37,68 ± 0,40	37,72 ± 0,6	37,78 ± 0,34	37,99 ± 0,44
Tratados	37,7 ± 0,32	37,84 ± 0,35	40,31 ± 0,24 ^{*b}	41,37 ± 0,33 ^{*b}	41,58 ± 0,24 ^{*b}

FONTE: A Autora (2021)

Legenda: ^{*}Diferença entre o estado pré-ambientação; ^b Diferença entre o grupo controle.

7.2 GLICEMIA SANGUÍNEA

Os valores de glicemia estão descritos na tabela 3 e demonstrados no gráfico 2. Não houve efeito principal do tratamento e ao longo das semanas na glicemia ($F_{(1,23)}=0,17$; $p=0,68$; $\eta_p^2=0,08$; $F_{(2,53)}=0,74$; $p=0,50$; $\eta_p^2=0,03$; respectivamente). Não houve interação na glicemia entre duração vs. tratamento ($p>0,05$). Demonstrando que o protocolo de estresse térmico não foi capaz de gerar alterações significativas nos valores de glicemia.

TABELA 3. Glicemia sanguínea (média±dp) avaliadas nos momentos basal, após primeira (1), segunda (2), terceira (3) e quarta (4) semana de intervenção nos grupos DTI e DC.

Glicemia (mg/dL)					
	Semanas após a STZ				
	Basal	1	2	3	4
DTI	429,17 ± 86,22	413,39 ± 71,79	441,89 ± 80,56	490,90 ± 72,10	455,1 ± 122,54
DC	421,76 ± 87,83	496,59 ± 78,10	498,47 ± 72,03	479 ± 69,91	516,78 ± 101,96

Fonte: A Autora (2021)

Legenda: DTI (Diabéticos com tratamento de imersão) e DC (Diabéticos controle).

7.3 PESO CORPORAL

Houve um efeito principal entre condição, tratamento e duração, no qual o peso corporal foi maior para os normoglicêmicos comparados aos diabéticos (efeito da condição), para o grupo controle comparados ao tratamento (efeito do tratamento) e entre as semanas de forma progressiva (efeito da duração) ($F_{(1,33)}=149,42$; $p=0,01$; $\eta_p^2=0,82$; $F_{(1,33)}=6,22$; $p=0,02$; $\eta_p^2=0,16$; $F_{(1,44)}=221,36$;

$p=0,01$; $\eta_p^2=0,87$; respectivamente), conforme descritos na tabela 4 e demonstrados no gráfico 3.

TABELA 4. Peso corporal (média $\pm$ dp) avaliados nos momentos basal, após primeira (1), segunda (2), terceira (3) e quarta (4) semana de intervenção nos grupos DTI, DC, NTI e NC.

Peso corporal (g) (média $\pm$ DP)					
	Semanas após a STZ				
	Basal	1	2	3	4
DTI	221,8 $\pm$ 17,11 ^o	234,9 $\pm$ 16,81 ^o	238,7 $\pm$ 16,22 ^o	238,4 $\pm$ 17,66 ^o	248,1 $\pm$ 13,03 ^{*o}
DC	223,44 $\pm$ 21,69 ^o	248,33 $\pm$ 20,67 ^{*o}	251,67 $\pm$ 25,35 ^{*o}	255,11 $\pm$ 25,35 ^{*o}	253,11 $\pm$ 30,98 ^{*o}
NTI	250,89 $\pm$ 20,9	307,56 $\pm$ 16,71 [*]	323,33 $\pm$ 16,08 ^{*ab}	340,33 $\pm$ 18,4 ^{*ab}	361,11 $\pm$ 21,26 ^{*ab}
NC	258 $\pm$ 30,59	324,78 $\pm$ 33,53 [*]	356,55 $\pm$ 36,4 ^{*a}	371,67 $\pm$ 32,47 ^{*a}	403,89 $\pm$ 36,42 ^{*a}

Fonte: A Autora (2021)

Legenda: ^{*} Diferença entre o estado basal; ^a Diferença entre a semana anterior; ^b Efeito do tratamento (tratados vs controle); ^o Efeito da condição (diabético vs normoglicêmicos). DTI (Diabéticos com tratamento de imersão); DC (Diabéticos controle); NTI (Normoglicêmicos com tratamento de imersão); e NC (Normoglicêmicos controle).

Houve uma interação entre semana e tratamento ($F_{(1,44)}=4,47$; $p=0,03$; $\eta_p^2=0,12$) na qual o peso aumentou progressivamente ao longo das semanas para o tratamento e para o controle ($p=0,01$).

Houve uma interação entre semana e condição ($F_{(1,44)}=90,88$; $p<0,01$; $\eta_p^2=0,73$) na qual o peso aumentou progressivamente ao longo das semanas para os diabéticos e normoglicêmicos ($p<0,01$).

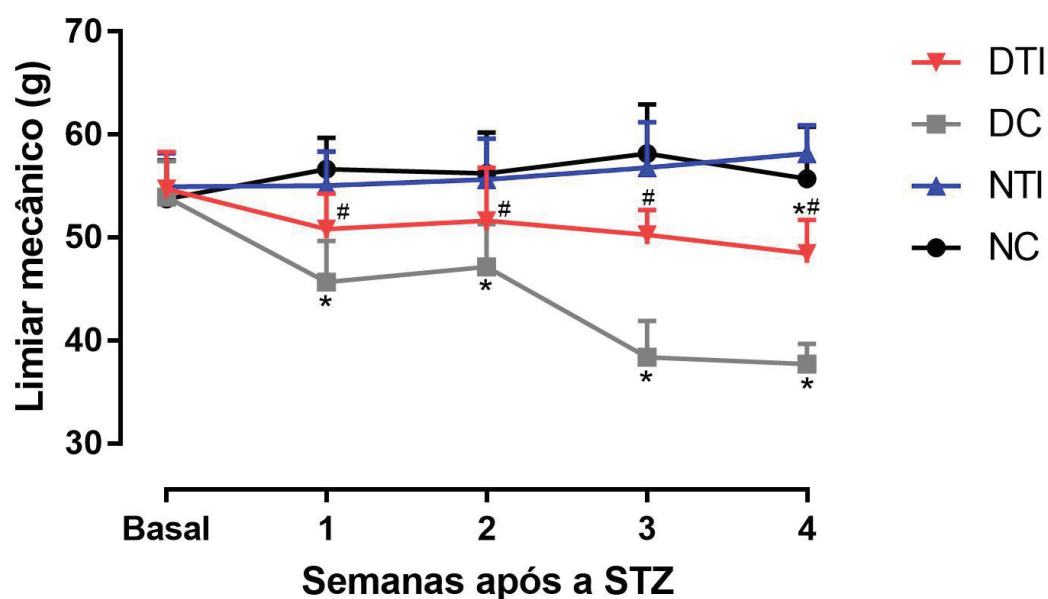
Houve o efeito do tratamento entre os animais normoglicêmicos, nas semanas 2, 3 e 4, no qual o peso dos animais tratados foi menor que o seu respectivo grupo controle (NTI vs. NC) ($p<0,01$). Nos grupos diabéticos, o DTI só obteve ganho significativo de peso na última semana quando comparado aos níveis basais ($p=0,04$), enquanto no grupo DC o ganho significativo de peso comparado aos níveis basais ocorreu a partir da primeira semana ($p<0,01$) e se manteve ao longo das 4 semanas de tratamento ($p<0,01$). Esses resultados demonstram o efeito do tratamento na diminuição do ganho de peso corporal.

Não houve interação no peso entre duração vs. condição vs. tratamento ($p>0,05$).

7.4 ALODINIA MECÂNICA

Os valores de limiar mecânico estão demonstrados no gráfico 1.

GRÁFICO 1. Alodinia mecânica (média $\pm$ dp) avaliadas nos momentos basal, após primeira (1), segunda (2), terceira (3) e quarta (4) semana de intervenção nos grupos DTI, DC, NTI e NC.



Fonte: A Autora (2021)

Legenda: * Diferença entre o estado basal; # Efeito do tratamento (DTI vs. DC) para o mesmo momento. DTI (Diabéticos com tratamento de imersão); DC (Diabéticos controle); NTI (Normoglicêmicos com tratamento de imersão); e NC (Normoglicêmicos controle).

Houve um efeito principal entre as condições e entre o tratamento, no qual o limiar mecânico foi maior para os normoglicêmicos comparados aos diabéticos e para os tratados comparados ao grupo controle ($F_{(1,33)}=204,11$; $p=0,01$; $\eta_p^2=0,86$; $F_{(1,33)}=33,05$; $p=0,01$; $\eta_p^2=0,50$; respectivamente).

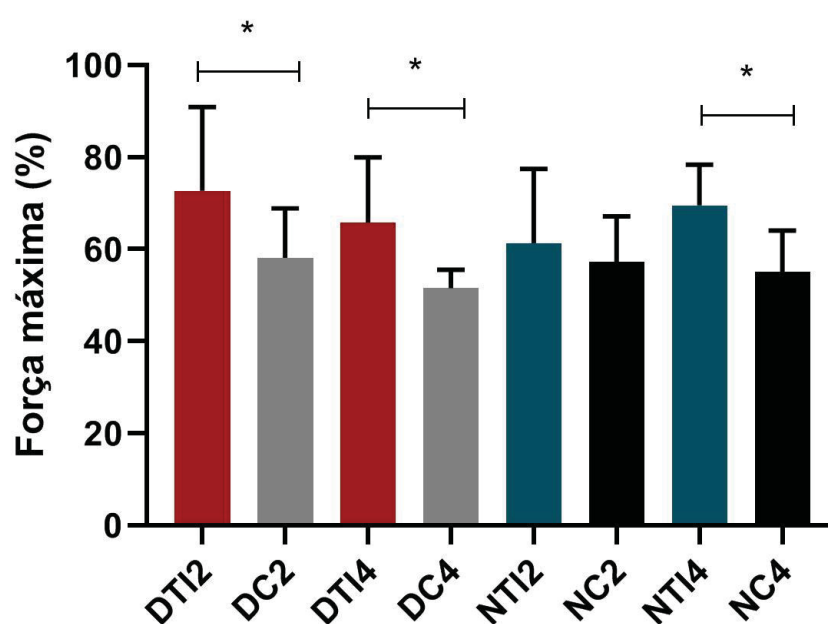
Houve interação entre condição vs. tratamento vs. semanas, ($F_{(4,13)}=4,30$; $p=0,003$; $\eta_p^2=0,11$), na qual os diabéticos do grupo controle tiveram uma diminuição progressiva do limiar mecânico ao longo das semanas ($p<0,01$).

Entre os animais diabéticos, o grupo tratado apresentou valores estatisticamente maiores que o grupo controle a partir da primeira semana de tratamento até a última semana (DTI vs. DC) ($p < 0,05$). No qual, semana 1: DTI = $50,85 \pm 3,47$ vs. DC = $45,67 \pm 4$; Semana 2: DTI = $51,63 \pm 5,17$ vs. DC = $47,18 \pm 4,18$; Semana 3: DTI = $50,27 \pm 2,4$ vs. DC = $38,39 \pm 3,51$; Semana 4: DTI = $48,47 \pm 3,27$ vs. DC = $37,72 \pm 1,95$. O que demonstra um efeito positivo do tratamento nesse desfecho analisado. Além disso, foram comparados os valores de cada semana de tratamento com o limiar mecânico basal, a fim de identificar se, apesar da diferença observada com o tratamento, em algum momento seria possível identificar uma alodinia mecânica nos animais tratados. Foi possível identificar que no grupo DTI os valores de limiar mecânico só foram menores que o valor basal na última semana de tratamento (basal = $54,72 \pm 3,59$ vs. semana 4 = $48,47 \pm 3,27$ ($p = 0,03$)), enquanto que para o grupo controle DC, essa redução já ocorreu logo a partir da primeira semana de tratamento (Basal = $53,96 \pm 3,49$ vs. semana 1 = $45,67 \pm 4$; Basal = $53,96 \pm 3,49$ vs. Semana 4 = $37,72 \pm 1,95$ ($p < 0,01$)). Demonstrando que o tratamento foi responsável por adiar a diminuição do limiar mecânico em animais diabéticos.

7.5 FORÇA MÁXIMA

Os valores de força máxima estão demonstrados no gráfico 2.

GRÁFICO 2. Força máxima relativa ao peso corporal



Fonte: A Autora (2021)

Legenda: * Efeito do tratamento (tratados vs. controle). DTI2 (Diabéticos com tratamento de imersão por 2 semanas); DTI4 (Diabéticos com tratamento de imersão por 4 semanas); DC2 (Diabéticos controle 2 semanas); DC4 (Diabéticos controle 4 semanas); NTI2 (Normoglicêmicos com tratamento de imersão por 2 semanas); NTI4 (Normoglicêmicos com tratamento de imersão por 4 semanas); e NC2 (Normoglicêmicos controle 2 semanas); NC4 (Normoglicêmicos controle 4 semanas).

Houve um efeito principal do tratamento, no qual a força máxima foi maior entre os animais tratados comparados ao grupo controle ($F_{(1,61)}=16$; $p=0,01$; $\eta_p^2=0,21$).

Houve efeito do tratamento entre os animais diabéticos avaliados após duas semanas, no qual os tratados tiveram aumentos significativos de força quando comparados ao controle (DTI2= $72,7 \pm 18,16\%$ vs. DC2= $58,09 \pm 10,78\%$) ($p=0,02$). O mesmo ocorreu entre os animais tratados durante quatro semanas quando comparados ao grupo controle (DTI4= $65,8 \pm 14,15\%$ vs. DC4= $51,51 \pm 3,99\%$) ($p=0,02$) e entre os animais normoglicêmicos tratados durante 4 semanas comparados ao controle (NTI4= $69,56 \pm 8,83\%$ vs. NC4= $55,16 \pm 8,86\%$) ($p=0,01$). O tratamento não teve efeito nos animais normoglicêmicos tratados durante duas semanas (NTI2= $61,33 \pm 16,12\%$ vs. NC2= $57,29 \pm 9,8\%$) ($p=0,49$).

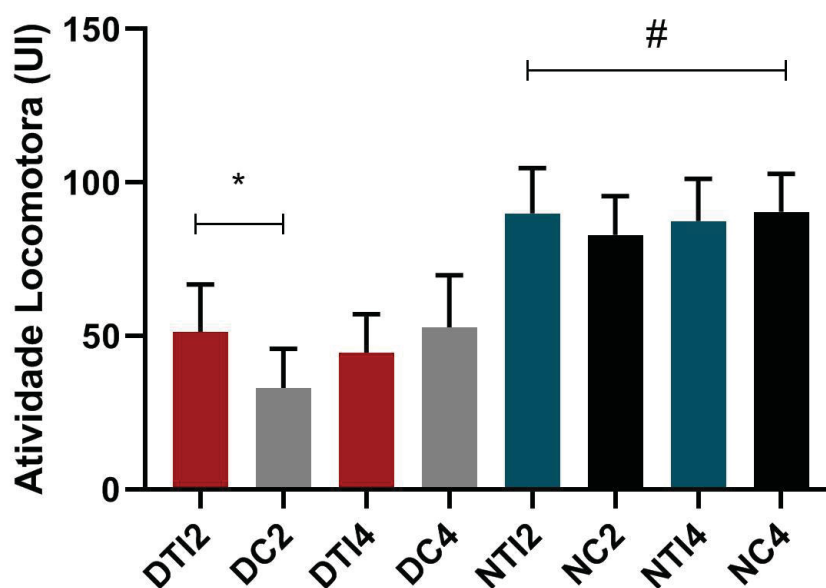
Não houve efeito principal da condição ($p=0,68$) e duração ($p=0,54$). Demonstrando que animais diabéticos e normoglicêmicos, avaliados com 2 e 4 semanas de tratamento não se diferenciaram de forma significativa nos valores de força máxima.

Não houve interação na força máxima entre duração vs. condição, duração vs. tratamento, tratamento vs. condição e duração vs. condição vs. tratamento ($p>0,05$).

7.6 ATIVIDADE LOCOMOTORA

O resultado do teste de campo aberto que avaliou a atividade locomotora está demonstrado no gráfico 3.

GRÁFICO 3. Atividade locomotora



Fonte: A Autora (2021)

Legenda: * Efeito do tratamento (tratados vs. controle); # Efeito da condição (diabéticos vs. normoglicêmicos). DTI2 (Diabéticos com tratamento de imersão por 2 semanas); DTI4 (Diabéticos com tratamento de imersão por 4 semanas); DC2 (Diabéticos controle 2 semanas); DC4 (Diabéticos controle 4 semanas); NTI2 (Normoglicêmicos com tratamento de imersão por 2 semanas); NTI4 (Normoglicêmicos com tratamento de imersão por 4 semanas); e NC2 (Normoglicêmicos controle 2 semanas); NC4 (Normoglicêmicos controle 4 semanas).

Houve um efeito principal da condição, na qual a atividade locomotora foi maior entre os animais normoglicêmicos comparados aos diabéticos ($F_{(1,63)}=161,31$; $p=0,01$; $\eta_p^2=0,72$). Não houve efeito principal do tratamento e da duração ($p>0,05$).

Houve interação entre tratamento vs. duração ($F_{(1,63)}=7,49$; $p=0,008$; $\eta_p^2=0,11$), na qual os tratados durante 2 semanas obtiveram valores maiores no teste comparados ao grupo controle ($p=0,01$).

Houve efeito do tratamento entre os diabéticos avaliados após duas semanas de intervenção, no qual a atividade locomotora foi maior nos animais tratados quando comparados ao grupo controle (DTI2=51,25±15,55 vs. DC2=33±12,79) ($p=0,01$). O mesmo efeito não foi observado nos demais grupos (DTI4=44,6±12,42 vs. DC4=52,78±16,98) ($p=0,21$), (NTI2=89,89±14,85 vs.

NC2=82,89±12,64) ($p=0,29$), (NTI4=87,44±13,78 vs. NC4=90,44±12,37) ($p=0,65$). Houve um efeito da duração entre os animais diabéticos do grupo controle, no qual os animais avaliados após 2 semanas apresentaram menor atividade locomotora que os avaliados em 4 semanas (DC2 vs. DC4) ($p=0,005$).

Não houve interação nos resultados de atividade locomotora entre duração vs. condição, tratamento vs. condição e duração vs. condição vs. tratamento ($p>0,05$).

7.7 PESO MUSCULAR

Os valores do peso muscular relativos ao peso corporal do músculo sóleo direito e esquerdo e do músculo gastrocnêmio direito e esquerdo estão descritos na tabela 6 e 7, respectivamente, e serão apresentados separadamente nos tópicos abaixo.

7.7.1 Sóleo direito

Não houve efeito principal do tratamento, condição e da duração ($p>0,05$). Não houve interação entre duração vs. condição, tratamento vs. Condição, duração vs. tratamento e duração vs. condição vs. tratamento ($p>0,05$).

Entre os grupos não tratados avaliados na semana 4, houve um efeito da condição no qual os animais diabéticos apresentaram um peso muscular relativo à massa corporal maior que os animais normoglicêmicos (DC4 vs. NC4) ($p=0,046$).

7.7.2 Sóleo esquerdo

Houve efeito principal da duração ($F_{(1,63)}=4,77$; $p=0,03$; $\eta_p^2=0,07$), no qual os animais avaliados após 2 semanas apresentaram um peso muscular relativo a massa corporal maior do que os animais avaliados após 4 semanas. Não houve efeito principal do tratamento e condição ($p>0,05$). Não houve interação entre duração vs. condição, tratamento vs. condição, duração vs. tratamento, e duração vs. condição vs. tratamento ($p>0,05$).

TABELA 6. Peso do músculo sóleo relativo ao peso corporal (média±dp)

Peso do músculo sóleo (%)								
	DTI2	DC2	DTI4	DC4	NTI2	NC2	NTI4	NC4
SE	0,038 ± 0,011	0,044 ± 0,017	0,035 ± 0,007	0,036 ± 0,009	0,038 ± 0,005	0,04 ± 0,007	0,035 ± 0,005	0,035 ± 0,003
SD	0,039 ± 0,013	0,046 ± 0,02	0,04 ± 0,015	0,047 ± 0,02 *	0,039 ± 0,004	0,04 ± 0,006	0,035 ± 0,007	0,035 ± 0,003

Fonte: A Autora (2021)

Legenda: * Efeito da condição. DTI2 (Diabéticos com tratamento de imersão por 2 semanas); DTI4 (Diabéticos com tratamento de imersão por 4 semanas); DC2 (Diabéticos controle 2 semanas); DC4 (Diabéticos controle 4 semanas); NTI2 (Normoglicêmicos com tratamento de imersão por 2 semanas); NTI4 (Normoglicêmicos com tratamento de imersão por 4 semanas); e NC2 (Normoglicêmicos controle 2 semanas); NC4 (Normoglicêmicos controle 4 semanas); SE (sóleo esquerdo); SD (sóleo direito).

7.7.3 Gastrocnêmio direito

Houve efeito principal da duração ($F_{(1,63)}=24,03$; $p=0,01$; $\eta_p^2= 0,28$), no qual os animais avaliados após 2 semanas apresentaram um valor de peso muscular relativo a massa corporal maior do que os animais avaliados após 4 semanas. Não houve efeito principal do tratamento e condição ($p>0,05$). Não houve interação entre duração vs. condição, tratamento vs. condição, duração vs. tratamento, e duração vs. condição vs. tratamento ($p>0,05$).

Entre os tratados normoglicêmicos, houve diferença no peso muscular em relação à duração, na qual os animais avaliados na quarta semana tiveram uma redução no peso muscular em relação aos animais avaliados na segunda semana (NTI4 vs. NTI2) ($p=0,01$). O mesmo ocorreu para os animais diabéticos do grupo controle (DC2 vs. DC4) ($p=0,002$) e para os animais normoglicêmicos do grupo controle (NC2 vs. NC4) ($p=0,036$).

7.7.4 Gastrocnêmio esquerdo

Houve efeito principal da duração ($F_{(1,63)}=20,38$; $p=0,01$; $\eta_p^2= 0,24$), no qual os animais avaliados após 2 semanas apresentaram um valor de peso muscular relativo ao peso corporal maior do que os animais avaliados após 4 semanas. Não houve efeito principal do tratamento e condição ($p>0,05$). Não houve

interação entre duração vs. condição, tratamento vs. condição, duração vs. tratamento, e duração vs. condição vs. tratamento ($p>0,05$).

Entre os tratados normoglicêmicos, houve diferença no peso muscular em relação à duração, na qual os animais avaliados na quarta semana tiveram uma redução no peso muscular em relação aos animais avaliados na segunda semana (NTI2 vs. NTI4) ($p=0,03$). O mesmo ocorreu para os animais diabéticos do grupo controle (DC2 vs. DC4) ($p=0,002$).

TABELA 7. Peso do músculo gastrocnêmio relativo ao peso corporal (média $\pm$ dp)

Peso do músculo gastrocnêmio (%)								
	DTI2	DC2	DTI4	DC4	NTI2	NC2	NTI4	NC4
GE	0,565 $\pm$ 0,147	0,625 $\pm$ 0,201 *	0,469 $\pm$ 0,061	0,442 $\pm$ 0,048	0,599 $\pm$ 0,065 *	0,627 $\pm$ 0,1	0,476 $\pm$ 0,156	0,533 $\pm$ 0,078
GD	0,569 $\pm$ 0,141	0,639 $\pm$ 0,198 *	0,476 $\pm$ 0,064	0,453 $\pm$ 0,056	0,622 $\pm$ 0,058 *	0,654 $\pm$ 0,116 *	0,477 $\pm$ 0,153	0,537 $\pm$ 0,082

Fonte: A Autora (2021)

Legenda: * Efeito da duração (2 vs. 4 semanas). DTI2 (Diabéticos com tratamento de imersão por 2 semanas); DTI4 (Diabéticos com tratamento de imersão por 4 semanas); DC2 (Diabéticos controle 2 semanas); DC4 (Diabéticos controle 4 semanas); NTI2 (Normoglicêmicos com tratamento de imersão por 2 semanas); NTI4 (Normoglicêmicos com tratamento de imersão por 4 semanas); e NC2 (Normoglicêmicos controle 2 semanas); NC4 (Normoglicêmicos controle 4 semanas); GE (gastrocnêmio esquerdo); GD (gastrocnêmio direito).

8 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos do aquecimento passivo, através da imersão em água quente, na dor neuropática e nas adaptações musculares em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por STZ. Para tanto, cinco hipóteses principais foram elaboradas. A partir dos resultados as hipóteses H1, H2 e H4 foram aceitas, demonstrando que o tratamento com imersão em água quente foi responsável por: H1) Atenuar e atrasar o aparecimento da dor neuropática diabética avaliada através do limiar mecânico; H2) Gerar ganhos significativos de força muscular em animais diabéticos e normoglicêmicos; H4) Melhorar a atividade locomotora em animais diabéticos tratados durante duas semanas. A hipótese H3 foi refutada, demonstrando que o tratamento de imersão em água quente não foi responsável

por gerar efeitos significativos no peso muscular dos animais tratados. Já a hipótese H5, foi aceita parcialmente, a hipótese esperava que o aquecimento passivo, através de imersão em água quente, de 4 semanas fosse capaz de gerar mais alterações nas adaptações musculares do que o protocolo de 2 semanas. Porém, isso só ocorreu para o desfecho de força muscular nos animais normoglicêmicos, demonstrando que apenas a imersão em água quente por quatro semanas foi capaz de gerar aumentos significativos no ganho de força e que duas semanas de protocolo não foram o suficiente para gerar os mesmos resultados. Entre os animais diabéticos, não houveram diferenças significativas entre os protocolos de 2 e 4 semanas. Para os demais desfechos que procuraram avaliar as adaptações musculares, como peso muscular e atividade locomotora, o protocolo de 4 semanas não foi superior que o protocolo de 2 semanas.

O aquecimento passivo teve efeito na atenuação do desenvolvimento da dor neuropática avaliada através do limiar mecânico. Enquanto os animais do grupo controle tiveram reduções significativas no limiar mecânico a partir da primeira semana após a indução ao diabetes, o grupo tratamento só teve reduções na quarta semana, demonstrando que o estresse térmico proporcionado pela imersão em água quente atenuou e atrasou o desenvolvimento de alodinia mecânica avaliada no von frey eletrônico. Esse efeito pode estar relacionado com um possível aumento na expressão da proteína HSP70. Essa proteína aumenta sua expressão devido à exposição à diversos estressores, incluindo o estresse térmico (MCGORM et al, 2018; KIM et al, 2020).

A HSP70 tem ganhado bastante destaque nos estudos relacionados à doenças neurodegenerativas, principalmente pelo seu papel importante como proteína chaperona, capaz de garantir o processamento correto de proteínas e a degradação de proteínas danificadas ou mal formadas, garantindo homeostase celular (KIM et al, 2020). De fato, a modulação dessa proteína tem sido indicada no tratamento da neuropatia diabética (MA, et al, 2013; DOBROWSKI, 2016). Ma e colaboradores (2013) demonstraram que o aumento da expressão de HSP70 induzido farmacologicamente através de KU-32, foi responsável por melhorar a neuropatia diabética em animais diabéticos do tipo 1 e 2, sendo esse efeito associado à melhora da bioenergética mitocondrial. Outro achado importante

desse estudo foi que em ratos diabéticos com nocaute de HSP70, não houve diminuição da neuropatia diabética, mostrando que a expressão de HSP70 foi o mecanismo chave na melhora da condição da doença. Vale ressaltar que muitos estudos com modulação de HSP70 tem sido feitos através de bloqueadores farmacológicos da HSP90, como é o caso de KU-32, KU-174, BGP-15 (DOBROWSKI, 2016). Essas moléculas são responsáveis por fazer com que o fator 1 de heat shock (HSF1) se dissocie da HSP90, se transloque até o núcleo da célula e gere o aumento de expressão da HSP70. Mas essa dissociação da HSF1 da HSP90 também pode ocorrer de forma não farmacológica após estresse celular, entre eles o estresse térmico (DOBROWSKI, 2016). De fato, um estudo que procurou modular a expressão de HSP70 através do estresse causado pelo exercício físico demonstrou que o aumento na expressão de HSP70 foi responsável por atrasar o aparecimento da dor neuropática em modelos animais (CHEN et al, 2013), resultado que corrobora com os achados do presente estudo. No estudo de Chen e colaboradores (2013) o exercício físico aeróbico foi responsável por atenuar a dor neuropática mensurada através do limiar mecânico até a terceira semana após a indução ao diabetes por STZ. Os pesquisadores associaram esses resultados ao efeito neuroprotetor da HSP70, que teve sua expressão aumentada na medula espinhal e nervos periféricos após o protocolo de exercício físico.

Em relação às adaptações musculares, o aquecimento passivo, através da imersão em água quente, teve efeitos significativos no ganho de força muscular no teste de subir escada, tanto em animais diabéticos, quanto em animais normoglicêmicos, sendo essa melhora observada após duas semanas em animais diabéticos, com um aumento de 14,61% de força ($p=0,02$), em quatro semanas de tratamento em animais diabéticos, com um aumento de 14,29% de força $p=0,02$, e após quatro semanas em animais normoglicêmicos, com um aumento de força de 14,4% ($p=0,01$), não havendo ganho de força no protocolo de duas semanas para animais normoglicêmicos. Houve também uma melhora de 36,61% ($p=0,01$) na atividade locomotora entre animais diabéticos tratados durante duas semanas, o que poderia indicar uma melhora na função muscular. Essa diferença não foi vista após quatro semanas de tratamento.

As adaptações musculares relacionadas ao aquecimento passivo tem sido bastante investigadas. Em modelos animais, muita atenção tem sido dada à hipertrofia muscular e atenuação da atrofia muscular (MCGORM et al, 2018), mas as investigações à cerca da força e função muscular tem sido mais investigadas em humanos (MCGORM et al, 2018; KIM et al, 2020; RODRIGUES et al, 2020), não havendo até o momento, de acordo com o conhecimento dos autores, estudos que avaliem força e função muscular através do aquecimento passivo em modelos animais. Em humanos, exposições repetidas ao aquecimento passivo tem demonstrado um aumento no torque máximo de extensores de joelho (GOTO et al, 2011; KIM et al 2020) e de flexores plantares (RACINAIS et al, 2017) e melhora na função muscular em pacientes com atrofia muscular (HAFEN et al, 2019) e sem patologias (GOTO et al, 2011; KIM et al, 2020). O estudo de Racinais e colaboradores (2017) demonstrou que 1 hora de aquecimento passivo, realizado por 11 dias, foi capaz de melhorar a força e função muscular. Os autores associaram essa melhora com uma possível mudança no número de formação de pontes cruzadas, ou na força das pontes cruzadas, associando portanto os resultados às propriedades contráteis do músculo. De acordo com os autores, os mecanismos para essas adaptações ainda precisam ser melhor elucidados, mas o aumento na expressão intramuscular de HSP72, pode estar associado à essas adaptações.

O aumento da expressão da HSP72 é uma resposta já esperada do aquecimento passivo e tem sido associada à hipertrofia muscular em modelos animais (OHNO et al, 2011; UEHARA et al, 2004). Além disso, outro mecanismo citado pelos autores é a ativação ou inibição de vias anabólicas importantes como a ativação da via Akt/mTOR (YOSHIHARA et al, 2013) e inibição da via NF-kB (OHNO et al, 2011), vias que também já foram relacionadas ao aumento de expressão das HSPs, no qual a deficiência de HSF1 foi associada à diminuição do ganho de massa muscular associada ao estresse térmico (OHNO et al, 2015). Entretanto, esses mecanismos parecem explicar muito mais os efeitos hipertróficos no músculo e 11 dias de intervenção não parecem ser suficientes para proporcionar força através da hipertrofia muscular. Sendo assim, analisar de forma mais criteriosa, inclusive os eventos à nível molecular, é importante para esclarecer os mecanismos que influenciam nesse desfecho.

Isso fica evidente no estudo realizado por Kim e colaboradores (2020), no qual o aumento na força através do aquecimento passivo não foi acompanhada de um aumento na área de secção transversa no músculo. Nesse estudo, o aquecimento passivo foi realizado por 90 minutos, com 5 intervenções semanais num total de 8 semanas. O protocolo foi capaz de gerar um aumento na contração voluntária máxima nos extensores de joelho após 4 e 8 semanas de intervenção, mas não foi capaz de gerar adaptações significativas na área de secção transversa do músculo vasto lateral, demonstrando que existem outras adaptações que podem influenciar na capacidade de geração de força.

Resultados controversos foram encontrados em outros estudos (LABIDI et al, 2020; STADNYK et al, 2018). Labidi e colaboradores (2020) demonstraram que 6 semanas de aquecimento passivo utilizando pads de calor na panturrilha por 8 horas, durante 5 dias semanais, não foi capaz de gerar efeitos significativos no aumento da contração voluntária máxima ou área de secção transversa do músculo gastrocnêmio. A diferença entre os resultados pode estar relacionada à diversos fatores, entre eles o método de aquecimento passivo realizado. De fato, em um estudo recente, Ihsan e colaboradores (2020) demonstraram que 1 hora de aquecimento passivo no corpo todo foi capaz de ativar as vias de sinalização Akt/mTOR, sinalização mitocondrial, aumento na expressão de HSP e inibição da via FoxO, enquanto o aquecimento passivo localizado não foi capaz de gerar os mesmos efeitos. Já no estudo de Stadnyk e colaboradores (2018) o aquecimento passivo por 12 semanas combinado com o treinamento resistido não foi capaz de induzir ganhos adicionais na força e hipertrofia muscular, demonstrando que o estresse térmico não tem efeito adicional no estresse mecânico. Sendo assim, efeitos diferentes do aquecimento passivo são esperados dependendo do público alvo e da técnica utilizada.

A temperatura muscular é o fator-chave para os efeitos do aquecimento, sendo que pequenas alterações podem influenciar na ativação das vias hipertróficas (GOTO et al, 2005; UEHARA et al, 2004), na expressão da HSP (NAITO et al, 2012; TOUCHBERRY et al, 2012) e na sinalização celular de síntese proteica (YOSHIHARA et al, 2013). Em modelos animais, a temperatura muscular atinge 41°C logo após os primeiros 10 minutos de imersão em água a 42°C (SCHIBAGUCHI et al, 2016). De acordo com Touchberry e colaboradores

(2012), o aumento da temperatura do core em $\sim 41^{\circ}\text{C}$ através da imersão em água quente por 20 minutos é o suficiente para o aumento da expressão de HSP72. Nosso estudo não avaliou a temperatura muscular, mas avaliou a temperatura do core. A imersão em água quente foi capaz de aumentar a temperatura acima de 40°C após 10 minutos de imersão e acima de 41°C após 20 e 30 minutos de imersão, sugerindo uma possível modulação na expressão de HSP70.

O possível aumento de HSP70 a partir do estresse térmico levantou a hipótese de que o aquecimento passivo poderia também atenuar uma possível atrofia muscular causada pela indução do diabetes experimental. Diversos estudos demonstraram que a indução do diabetes pela STZ é capaz de gerar atrofia muscular (ISHIDA et al, 2019; WANG et al, 2018; RUSBANA et al, 2020). Enquanto isso, alguns estudos utilizando aquecimento passivo demonstraram atenuação da atrofia muscular em modelos animais submetidos à protocolos de desuso ou desnervação muscular (SHIBAGUCHI et al, 2016; OHIRA et al, 2017). Além disso, havia a hipótese de que o aquecimento passivo poderia gerar ainda uma hipertrofia em animais não patológicos, como já foi observado em outros estudos (UEHARA et al, 2004, SHIBAGUCHI et al, 2016). Sendo assim, os músculos sóleo e gastrocnêmio foram dissecados e pesados. Entretanto, não houve diferença significativa no peso muscular relativo ao peso corporal em relação ao tratamento, ou seja, tratados não apresentaram diferença no peso muscular em relação ao controle. Também não houve diferença significativa entre as condições glicêmicas, no qual os animais diabéticos não apresentaram diferenças no peso muscular em relação aos animais normoglicêmicos. Esse resultado pode estar associado à um aumento na gordura intramuscular associada à diabetes, que pode acabar mascarando os efeitos na atrofia muscular, quando considerado apenas o peso do músculo (ALMURDHI et al, 2016a; ALMURDHI et al, 2016b).

Nosso estudo avaliou o efeito do aquecimento no peso muscular após 2 e 4 semanas de intervenção e não foram observadas diferenças significativas nesse desfecho. Nossos resultados corroboram com os achados encontrados por Shibaguchi e colaboradores (2016), que realizaram o aquecimento passivo em animais com lesão muscular induzida por injeção de bupivacaína. Duas semanas

de tratamento não tiveram efeitos significativos no peso muscular dos animais com lesão e no grupo controle. Entretanto, ao analisar a área de secção transversa, foi possível perceber que o grupo com lesão tratado com aquecimento passivo teve uma recuperação mais rápida na atrofia muscular, com um aumento na área de secção transversa no músculo sóleo, o que não foi possível de ser detectado apenas com o peso do músculo. Isso pode indicar que apenas a medida do peso muscular não seja tão sensível as adaptações relacionadas à hipertrofia que podem ocorrer no músculo após o estresse térmico. Porém diversos estudos que avaliaram apenas o peso muscular encontraram diferenças significativas com o aquecimento passivo. Uehara e colaboradores (2004) realizaram uma única sessão de aquecimento passivo durante uma hora em uma câmara de calor, com a temperatura do core sendo mantida $\sim 41^{\circ}\text{C}$. Nos dias 1, 7 e 14 após a sessão de estresse térmico os animais foram eutanasiados e os músculos sóleo foram dissecados. Houve um aumento significativo no peso muscular, relativo ao peso corporal, dos animais que realizaram aquecimento passivo 7 dias após a exposição, enquanto 1 dia e 14 dias após não foram detectadas diferenças. Achados parecidos foram encontrados por Ohira e colaboradores (2017), que realizaram aquecimento passivo através de imersão em água quente (42°C) nas patas traseiras de animais com desnervação cirúrgica e grupo controle. Foi observado um aumento no peso do músculo sóleo, relativo ao peso corporal, tanto nos animais operados, quanto no grupo controle. Esse aumento foi acompanhado de um aumento na área de secção transversa do músculo, indicando atenuação da atrofia no músculo desnervado e hipertrofia nos animais do grupo controle. No estudo de Ohno e colaboradores (2010) realizado em modelos animais, uma única sessão de aquecimento passivo de 60 minutos também foi capaz de aumentar o peso do músculo sóleo, relativo ao peso corporal, 7 dias após o tratamento. Esse resultado foi acompanhado pelo aumento na HSP72, que também teve sua expressão aumentada 7 dias após a intervenção. De forma geral os estudos tem demonstrado que o aquecimento passivo é capaz de gerar hipertrofia em animais saudáveis ou atenuação da atrofia muscular em animais com alguma patologia induzida. A diferença entre os resultados pode estar associada à diferença nos métodos de análise, na condição do diabetes experimental, assim como a própria indução à atrofia que pode influenciar nas análises e resultados.

Por fim, não foram encontradas alterações na glicemia sanguínea durante o tratamento com aquecimento passivo. Apesar de diversos estudos estarem utilizando o estresse térmico no controle da glicemia, esse mecanismo influencia na patogênese da resistência à insulina, sendo seus efeitos associados ao diabetes do tipo 2 (MULYANI et al, 2020). Dessa forma, as alterações no perfil glicêmico não eram esperadas durante nosso estudo, devido ao modelo de diabetes adotado.

8.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E APLICAÇÕES PRÁTICAS

Existem algumas limitações do estudo, como por exemplo a não mensuração da temperatura muscular, tendo como parâmetro apenas a temperatura do core. Além disso, uma análise mais sensível da hipertrofia muscular talvez pudesse apresentar resultados significativos para o ganho de massa muscular, como por exemplo a análise do peso muscular desidratado ou até mesmo uma análise histológica.

Outro aspecto limitante foi a não mensuração da glicose sanguínea em animais normoglicêmicos, impedindo a análise dos efeitos do estresse térmico no perfil glicêmico de forma mais ampla.

O presente estudo sugere aplicações práticas importantes. Até o momento, de acordo com o conhecimento dos autores, são extremamente escassos os estudos que utilizaram o estresse térmico no tratamento da dor neuropática e nas adaptações musculares associadas ao diabetes. As análises comportamentais sugerem perspectivas importantes acerca da utilização do aquecimento passivo na área da prática clínica. De qualquer forma, deve-se ter precaução em extrapolar esses resultados em modelos humanos. Novos estudos analisando os eventos moleculares em humanos com diabetes são importantes para entender o papel do aquecimento passivo na progressão da PND, dor neuropática e disfunções musculares associada à essa patologia. Além disso, esse estudo fornece diretrizes importantes de como pode ser realizado o protocolo de aquecimento passivo com imersão em água quente em modelos animais.

9 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento de aquecimento passivo, através da imersão em água quente a 42°C realizado durante quatro semanas, foi capaz de atenuar e atrasar o desenvolvimento de da dor neuropática associada ao diabetes em modelos animais. Além disso, o tratamento de aquecimento passivo foi eficaz no aumento da força muscular em animais diabéticos após duas e quatro semanas de tratamento. O aquecimento passivo também aumentou a produção de força muscular em animais normoglicêmicos após 4 semanas de tratamento. Após duas semanas de tratamento, foi observado aumento da atividade locomotora em animais diabéticos. Não foram encontradas mudanças no perfil glicêmico e na massa muscular o e relativo ao peso corporal após o tratamento com aquecimento passivo. Tendo em vista que não houveram alterações na massa muscular, especulamos que os efeitos do tratamento na força foram influenciados mais pelas adaptações neurais do que hipertróficas, o que também ajudam a explicar a diminuição da dor neuropática.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C. A.; MALIK, R. A.; VAN ROSS, E. R., et al. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. **Diabetes Care**, v. 34, p. 2220–2224, 2011.
- ALLEN, M. D; DOHERTY, T. J; RICE, C. L; e KIMPINSKI, K. Physiology in Medicine: neuromuscular consequences of diabetic neuropathy. **Journal of Applied Physiology**, v. 121(1), p. 1–6, 2016.
- ALLEN, M.D; CHOI, I; KIMPINSKI, K; et al. Motor unit loss and weakness in association with diabetic neuropathy in humans. **Muscle Nerve**, v. 48, p. 298–300, 2013.
- ALLEN, M.D; KIMPINSKI, K; DOHERTY, T.J; RICE, C.L. Length dependent loss of motor axons and altered motor unit properties in human diabetic polyneuropathy. **Clin Neurophysiol**, v. 125, p. 836–843, 2014.
- ALLEN, M.D; MAJOR, B; KIMPINSKI, K; et al. Skeletal muscle morphology and contractile function in relation to muscle denervation in diabetic neuropathy. **J Appl Physiol**, v. 116, p. 545–555, 2014.
- ALMURDHI, M. M., REEVES, N. D., BOWLING, F. L., et al. Distal lower limb strength is reduced in subjects with impaired glucose tolerance and is related to elevated intramuscular fat level and vitamin D deficiency. **Diabetic Medicine**, v.34(3), p.356–363, 2016a.
- ALMURDHI, M. M., REEVES, N. D., BOWLING, F. L., et al. Reduced Lower-Limb Muscle Strength and Volume in Patients With Type 2 Diabetes in Relation to Neuropathy, Intramuscular Fat, and Vitamin D Levels. **Diabetes Care**, v.39(3), p.441–447, 2016b.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 41(1), p. 13–27, 2018.
- ANDERSEN, H; GJERSTAD, M.D; JAKOBSEN, J. Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. **Diabetes Care**, v. 27, p. 2382–2385, 2004.
- ANDREASSEN, C; JAKOBSEN, J; e ANDERSEN, H. Muscle weakness a progressive late complication in diabetic distal symmetric polyneuropathy. **Diabetes**, v. 55, p. 806–812, 2006.
- AZBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. **Indian J Clin Biochem**, v.22(2), p. 60-64, 2007.

BAKERMAN, R. Recommended effect size statistics for repeated measures designs. **Behav. Res. Methods**, v.37(3), p. 379–384, 2005.

BENNETT, D. L. e WOODS, C. G. Painful and painless channelopathies. *Lancet Neurol*, v. 13, p. 587–599, 2014.

BIERHAUS, A. et al. Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. **Nat. Med.**, v. 18, p. 926–933, 2012.

BLAIR, N. T. e BEAN, B. P. Roles of tetrodotoxin (TTX)- sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. **J. Neurosci**, v. 22, p. 10277–10290, 2002.

BLESNEAC, I. et al. Rare Nav1.7 variants associated with painful diabetic peripheral neuropathy. **Pain**, v. 159, p. 469–480, 2017.

BODINE, S.C.; STITT, T.N.; GONZALEZ, M.; et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol.** 3(11):1014–9, 2001.

BONALDO, P; e SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6(1), p. 25–39, 2012.

CAUDA, F. et al. Low-frequency BOLD fluctuations demonstrate altered thalamocortical connectivity in diabetic neuropathic pain. **BMC Neurosci**, v. 10, p. 138, 2009.

CHEN, H.W.; et al. Previous hyperthermic treatment increases mitochondria oxidative enzyme activity and exercise capacity in rats. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v.15, p. 572-580, 1999.

CHEN, Y.W.; HSIESH, P.L.; CHEN, Y.C.; HUNG, C.H.; CHENG, J.T. Physical exercise induces excretion hsp72 expression and delays the development of hyperalgesia and allodynia in painful diabetic neuropathy rats. **Anesthesia e Analgesia**, v. 116(2), p. 482–490, 2013.

CHIANG, J.L.; KIRKMAN, M.S.; LAFFEL, L.M.; PETER, A.L. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 37, p. 2034–54, 2014.

CHOU, S.D.; et al. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. **PLoS One**. v. 7(6), e, 39679, 2012.

COHEN, J. Statistical power analysis for the behavioral sciences, second edition. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**, 1988.

DIB-HAJJ, S. D.; YANG, Y.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. The NaV1.7 sodium channel: from molecule to man. **Nat. Rev. Neurosci**, v. 14, p. 49–62, 2013.

DIMEGLIO, L.A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R.A. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 391, p. 2449–62, 2018.

DOBROWSKI, R. T. Targeting the Diabetic Chaperome to Improve Peripheral Neuropathy. **Current Diabetes Reports**, v.16(8), 2016.

DUBIN, A. E. e PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J. Clin. Invest**, v. 120, p. 3760–3772, 2010.

DYCK, P.J; ALBERS, J.W.; ANDERSEN, H.; Toronto Expert Panel on Diabetic Neuropathy. Diabetic polyneuropathies: update on research definition diagnostic criteria and estimaton of severity. **Diabetes Metab Res Ver**, v. 37, p. 620–628, 2011.

EMERY, S. M., e DOBROWSKI, R. T. Promoting Neuronal Tolerance of Diabetic Stress. **Controversies In Diabetic Neuropathy**, p.181–210, 2016.

ENGLAND, J.D.; BRONSETH, G.S.; FRANKLIN, G.; et al. Distal symmetric polyneuropaty: a definition for clinical research. **Neurology**, v. 64, p. 199–207, 2005.

FELDMAN, E. L.; NAVE, K. A., JENSEN, T. S.; BENNETT, D. L. H. New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. **Neuron**, v. 93, p. 1296–1313, 2017.

FELDMAN, E.L.; CALLAGHAN, B.C.; POP-BUSUI, R.; et al. Diabetic neuropathy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5(1), 2019.

FERRARA, C.T.; GEYER, S.M.; LIU, Y.F.; et al. Excess BMI in childhood: a modifiable risk factor for type 1 diabetes development? **Diabetes Care**, v. 40, p. 698–701, 2017.

FERNYHOUGH, P. e MCGAVOCK, J. Mechanisms of disease: mitochondrial dysfunction in sensory neuropathy and other complications in diabetes. **Handb. Clin. Neurol**, v. 126, p. 353–377, 2014.

FERNYHOUGH, P. Mitochondrial dysfunction in diabetic neuropathy: a series of unfortunate metabolic events. **Curr. Diab. Rep**, v. 15, p. 89, 2015.

FORGA, L.L.; GONI, I.M.J.; CAMBRA, C.K.; et al. Incidence and temporal trends of childhood type 1 diabetes between 1975 and 2012 in Navarre (Spain). **Gac Sanit**, v. 29, p. 51–54, 2015.

FURUNO, K; GOODMAN, M. N; e GOLDBERG, A. L. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. **J. Biol. Chem**, v. 265, p. 8550-8557, 1990.

GARCIA-PEREZ, E. et al. Behavioural, morphological and electrophysiological assessment of the effects of type 2 diabetes mellitus on large and small nerve fibres in Zucker diabetic fatty, Zucker lean and Wistar rats. **Eur. J. Pain**, v. 22, p. 1457–1472, 2018.

GOTO, A.; et al. Heat stress acutely activates insulin-independent glucose transport and 5'- AMP-activated protein kinase prior to an increase in HSP72 protein in rat skeletal muscle. **Physiological reports**, v.3, 2015.

GOTO, K.; OKUYAMA, R.; SUGIYAMA H.; et al. Effects of heat stress and mechanical stretch on protein expression in cultured skeletal muscle cells. **Pflugers Arch**. 447(2):247–53, 2003.

GOTO, K.; ODA, H.; KONDO, H.; et al. Responses of muscle mass, strength and gene transcripts to long-term heat stress in healthy human subjects. **Eur J Appl Physiol**.;111(1):17–27, 2011.

GOTO, K.; ODA, H.; MORIOKA, S.; et al. Skeletal muscle hypertrophy induced by low-intensity exercise with heat-stress in healthy human subjects. **Jpn J Aerosp Environ Med**.;44(1):13–8, 2007.

GOZUACIK, D; e KIMCHI, A. Autophagy and cell death. **Curr. Top. Dev. Biol**, v. 78, p. 217–245, 2007.

HAFEN, P.S.; et al. Repeated exposure to heat stress induces mitochondrial adaptation in human skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, 2018.

HUIZINGA, M. M.; PELTIER, A. Painful Diabetic Neuropathy: A Management-Centered Review. **Clinical Diabetes**, v. 25, p. 6-15, 2007.

HULL, C.M.; PEAKMAN, M.; TREE, T. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? **Diabetologia**, v. 60, p. 1839–50, 2017.

HUNT, A. P.; MINETT, G. M.; GIBSON, O. R.; KERR, G. K.; e STEWART, I. B. Could Heat Therapy Be an Effective Treatment for Alzheimer's and Parkinson's Diseases? **A Narrative Review. Frontiers in Physiology**, v. 10, 2020.

IHSAN, M., DELDICQUE, L., MOLPHY, J., et al. Skeletal muscle signaling following whole-body and localized heat exposure in humans. **Front Physiol**, v.11, p.839, 2020.

ISHIDA, T., IIZUKA, M., OU, Y., et al. Juzentaihoto Suppresses Muscle Atrophy in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.42(7), p.1128–1133, 2019.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Disponível em: <http://www.idf.org/about-diabetes>. Acesso em: 02/03/2020.

KIM, K.; et al. Skeletal muscle adaptations to heat therapy. **Journal of Applied Physiology**, 2020a.

KIM, K.; REID, B.A., CASEY, C.A., et al. Effects of repeated local heat therapy on skeletal muscle structure and function in humans. **J Appl Physiol**, v.128(3), p.483–492, 2020b.

KIM, J. Y., BARUA, S., HUANG, M. Y., et al. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury. **Cells**, v.9(9), 2020c.

KOBAYAH, T.; et al. Possible role of calcineurin in heating-related increase of rat muscle mass. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 331, p. 1301-1309, 2015.

LABIDI, M., IHSAN, M., BEHAN, F. P., et al. Six weeks of localized heat therapy does not affect muscle mass, strength and contractile properties in healthy active humans. **European Journal of Applied Physiology**, 2020.

LAPLANTE, M; e SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. **Cell**, v. 149(2), p. 274–293, 2012.

LECKER, S. H; GOLDBERG, A.L; MITCH, W.E. Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17(7), p. 1807–1819, 2006.

LI, Q. S. et al. SCN9A variants may be implicated in neuropathic pain associated with diabetic peripheral neuropathy and pain severity. **Clin. J. Pain**, v. 31, p. 976–982, 2015.

LUPACHYK, S.; WATCHO, P.; STAVNIICHUK, R.; et al. Endoplasmic reticulum stress plays a key role in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes**, v. 62, p. 944–952, 2013.

MA, J., FARMER, K. L., PAN, P., et al. Heat Shock Protein 70 Is Necessary to Improve Mitochondrial Bioenergetics and Reverse Diabetic Sensory Neuropathy following KU-32 Therapy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.348(2), p.281–292, 2013.

MA, J.; PAN, P.; ANYIKA, M.; et al. Modulating molecular chaperones improves mitochondrial bioenergetics and decreases the inflammatory transcriptome in diabetic sensory neurons. **ACS Chem. Neurosci**, v. 6, p. 1637–1648, 2015.

MAAHS, D.M.; WEST, N.A.; LAWRENCE, J.M.; MAYER-DAVIS, E.J. Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 39, p. 481–97, 2010.

MARSHALL, A. G. et al. Spinal disinhibition in experimental and clinical painful diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 66, p. 1380–1390, 2017.

MAYER-DAVIS, E.J.; LAWRENCE, J.M.; DABELEA, D.; et al. Incidence trends of type 1 and type 2 diabetes among youths, 2002–2012. **N Engl J Med**, v. 376, p. 1419–29, 2017.

MCGORM, H.; ROBERTS, L. A.; COOMBERS, J. S., & PEAKE, J. M. Turning Up the Heat: An Evaluation of the Evidence for Heating to Promote Exercise Recovery, Muscle Rehabilitation and Adaptation. **Sports Medicine**, 1-18, 2018.

MITCH, W.E; e GOLDBERG, A.L. Mechanisms of muscle wasting: The role of the ubiquitin-proteasome system. **N Engl J Med**, v. 335, p. 1897–1905, 1996.

MIZUSHIMA, N; et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451(7182), p. 1069–1075, 2008.

MORIMOTO, Y., KONDO, Y., KATAOKA, H., HONDA, Y., KOZU, R., MORTON, J. P., MACLAREN, D. P. M., CABLE, N. T., et al. Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. **Acta physiologica**, 190(4), 319-327, 2007.

MORTON, J. P.; et al. Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. **Acta physiologica**, 190(4), 319-327, 2007.

MULYANI, W. R. W., SANJIWANI, M. I. D., SANDRA, S., et al. Chaperone-Based Therapeutic Target Innovation: Heat Shock Protein 70 (HSP70) for Type 2 Diabetes Mellitus. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v.13, p.559–568, 2020.

NAITO, H.; et al. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. **J Appl Physiol**, v. 88(1), p. 359–363, 2000.

NAITO, H., YOSHIHARA, T., KAKIGI, R., ICHINOSEKI-SEKINE, N., & TSUZUKI, T. Heat stress-induced changes in skeletal muscle: Heat shock proteins and cell

signaling transduction. **The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine**, 1(1), 125-131, 2012.

NOSAKA, K.; et al. Influence of pre-exercise muscle temperature on responses to eccentric exercise. **J Athl Train**, v. 39(2), p. 132–7, 2004.

OHIRA, T.; et al. The effects of heat stress on morphological properties and intracellular signaling of denervated and intact soleus muscles in rats. **Physiological reports**, v. 5, 2017.

OHNO, Y., YAMADA, S., SUGIURA, T., OHIRA Y., YOSHIKA, T., & GOTO, K. A possible role of NF- κ B and HSP72 in skeletal muscle hypertrophy induced by heat stress in rats. **General physiology and biophysics**, 29(3), 234, 2010.

OISHI, Y., ROY, R. R., OGATA, T., & OHIRA Y. Heat-Stress effects on the myosin heavy chain phenotype of rat soleus fibers during the early stages of regeneration. **Muscle & nerve**, 52(6), 1047-1056, 2015.

ORLANDO, G.; BALDUCCI, S.; BAZZUCCHI, I.; PUGLIESE, G.; SACCHETTI, M. Neuromuscular dysfunction in type 2 diabetes: underlying mechanisms and effect of resistance training. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 32, p. 40–50, 2016.

ORSTAVIK, K. et al. Abnormal function of C-fibers in patients with diabetic neuropathy. **J. Neurosci**, v. 26, p. 11287–11294, 2006.

PADILLA, A.; DESCORBETH, M.; ALMEYDA, A. L.; et al. Hyperglycemia magnifies Schwann cell dysfunction and cell death triggered by PA-induced lipotoxicity. **Brain Res**, v. 1370, p. 64–7, 2011.

PAULAUSKAS, H., BARANAUSKIENE, N., WANG, J., et al. Local knee heating increases spinal and supraspinal excitability and enhances plantar flexion and dorsiflexion torque production of the ankle in older adults. **Eur J Appl**, 2020.

RACINAIS, S., WILSON, M. G., e PÉRIARD, J. D. Passive heat acclimation improves skeletal muscle contractility in humans. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.312(1), p.101–107, 2017.

RAMJI, N.; TOTH, C.; KENNEDY, J.; ZOCHODNE, D.W. Does diabetes mellitus target motor neurons? **Neurobiol Dis**, v. 26, p. 301–311, 2007.

REDIVO, D. D. B.; et al. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 298, p. 57–64, 2016)

REWERS, M.; LUDVIGSON, J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. **Lancet**, v. 387, p. 2340–48, 2016.

RODRIGUES, P.; TRAJANO, G. S.; WHARTON, L.; e MINETT, G. M. Effects of passive heating intervention on muscle hypertrophy and neuromuscular function: A preliminary systematic review with meta-analysis. **Journal of Thermal Biology**, 102684, 2020.

ROGERS, M.A.M.; KIM, C.; BANERJEE, T.; LEE, J.M. Fluctuations in the incidence of type 1 diabetes in the United States from 2001 to 2015: a longitudinal study. **BMC Med**, v. 15, p. 199, 2017.

ROWSELL, G.J.; COUTTS, A.J.; REABURN, P.; HILL-HAAS, S. Effects of cold-water immersion on physical performance between successive matches in high-performance junior male soccer players. **J Sports Sci**. v. 27, n. 9, p. 565-73; 2009.

RUMORA, A. E.; et al. Dyslipidemia impairs mitochondrial trafficking and function in sensory neurons. **FASEB J**, v. 32, p. 195–207, 2018.

RUSBANA, T. B., AGISTA, A. Z., SAPUTRA, W. D. et al. Supplementation with Fermented Rice Bran Attenuates Muscle Atrophy in a Diabetic Rat Model. **Nutrients**, v.12(8), p.2409, 2020.

SAGA, N.; KATAMOTO, S.; NAITO, H. Effect of heat preconditioning by microwave hyperthermia on human skeletal muscle after eccentric exercise. **J Sports Sci Med**, v.7, p. 176–83, 2008.

SAID, G; BAUDOIN, D; e TOYOOKA, K. Sensory loss, pains, motor deficit and axonal regeneration in length-dependent diabetic polyneuropathy. **J Neurol**, v. 255, p. 1693–702, 2008.

SALTER, M. W. e BEGGS, S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. **Cell**, v. 158, p. 15–24, 2014.

SANTIAGO, R. M. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104-1114, 2010.

SCHIAFFINO, S; e MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. **Skeletal Muscle**, v. 1(1), p. 4, 2011.

SCOTT, J. N.; CLARK, A. W.; ZOCHODNE, D. W. Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. **Brain**, v. 122, p. 2109–2118, 1999.

SELVARAJAH, D. et al. Magnetic resonance neuroimaging study of brain structural differences in diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Care**, v. 37, p. 1681–1688, 2014.

SHIBAGUCHI, T., SUGIURA, T., FUJITSU, T., NOMURA, T., et al. Effects of icing or heat stress on the induction of fibrosis and/or regeneration of injured rat soleus muscle. **The Journal of Physiological Sciences**, 66(4), 345-357, 2016.

SINGH, V. P.; BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean J. Physiol. Pharmacol**, v. 18, p. 1–14, 2014.

SKURVYDAS, A.; et al. Leg immersion in warm water, stretch-shortening exercise, and exercise-induced muscle damage. **J Athl Train**, v. 43(6), p. 592–9, 2008.

SOUAYAH, N; POTIAN, J.G; GARCIA, C.C; et al. Motor unit number estimate as a predictor of motor dysfunction in an animal model of type 1 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metabol**, v. 297, p. 602–8, 2009.

STADNYK, A. M. J., REHRER, N. J., HANDCOCK, P. J., et al. No clear benefit of muscle heating on hypertrophy and strength with resistance training. **Temperature**, v.5(2), p.175–183, 2017.

STRECKMANN, F.; ZOPF, E.M.; LEHMANN, H.C.; et al. Exercise intervention studies in patients with peripheral neuropathy: a systematic review. **Sports Med**, v. 44, p. 1289–1304, 2014.

SUZUKI, Y.; SATO, J.; KAWANISHI, M.; MIZIMURA, K. Lowered response threshold and increased responsiveness to mechanical stimulation of cutaneous nociceptive fibers in streptozotocin-diabetic rat skin in vitro — correlates of mechanical allodynia and hyperalgesia observed in the early stage of diabetes. **Neurosci. Res**, v. 43, p. 171–178, 2002.

TAKEUCHI, K., HATADE, T., WAKAMIYA, S., FUJITA, N., ARAKAWA, T., & MIKI, A. Heat stress promotes skeletal muscle regeneration after crush injury in rats. **Acta histochemica**, 116(2), 327-334, 2014.

TAN, A. M. et al. Maladaptive dendritic spine remodeling contributes to diabetic neuropathic pain. **J. Neurosci**, v. 32, p. 6795–6807, 2012.

TAMURA, Y., KITAOKA, Y., MATSUNAGA, Y., HOSHINO, D., & HATTA, H. Daily heat stress treatment rescues denervation-activated mitochondrial clearance and atrophy in skeletal muscle. **The Journal of physiology**, 593(12), 2707-2720, 2015.

THANKUR, S.S; SWIDERSKI K; RYALL J.G, et al. Therapeutic potential of heat shock protein Induction for muscular dystrophy and other muscle wasting conditions. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 373(1738):20160528, 2018.

UEHARA, K., GOTO, K., KOBAYASHI, T., KOJIMA A., AKEMA, T., SUGIURA, et al. Heat-stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. **The Japanese journal of physiology**, 54(3), 263-271, 2004.

URBAN, M. J.; et al. Modulating molecular chaperones improves sensory fiber recovery and mitochondrial function in diabetic peripheral neuropathy. **Exp. Neurol**, v. 235, p. 388–396, 2012.

VAILE, J.; et al. Effect of hydrotherapy on the signs and symptoms of delayed onset muscle soreness. **Eur J Appl Physiol**, v. 102(4), p. 447–55, 2008.

VIADER, A. et al. Aberrant Schwann cell lipid metabolism linked to mitochondrial deficits leads to axon degeneration and neuropathy. **Neuron**, v. 77, p. 886–898, 2013.

VINCENT, A. M.; CALLAGHAN, B. C.; SMITH, A. L.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nat. Rev. Neurol**, v. 7, p. 573–583, 2011.

VINCENT, A. M.; KATO, K.; MCLEAN, L. L.; et al. Sensory neurons and schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidante defense mechanisms. **Antioxid. Redox Signal**, v. 11, p. 425–438, 2009.

VINCENT, A. M.; EDWARDS, J. L.; SADIDI, M.; FELDMAN, E. L. The antioxidant response as a drug target in diabetic neuropathy. **Curr. Drug Targets**, v. 9, p. 94–100, 2008.

VINCENT, A. M.; CALABEK, B.; ROBERTS, L.; FELDMAN, E. L. Biology of diabetic neuropathy. **Handb. Clin. Neurol**, v. 115, p. 591–606, 2013.

VINCENT, A. M.; RUSSELL, J. W.; LOW, P.; FELDMAN, E. L. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocr. Ver**, v. 25, p. 612–628, 2004.

VON HEHN, C. A.; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**, v. 73, p. 638–652, 2012.

WANG, D., SUN, H., SONG, G., et al. Resveratrol Improves Muscle Atrophy by Modulating Mitochondrial Quality Control in STZ-Induced Diabetic Mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.62(9), 2018.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, p. S2–15, 2011.

YOSHIHARA, T.; NAITO, H.; KAKIGI, R.; et al. Heat stress activates the Akt/mTOR signalling pathway in rat skeletal muscle. **Acta Physiol**, v. 207(2), p. 416–26, 2012.

YOSHIHARA T.; et al. The response of apoptotic and proteolytic systems to repeated heat stress in atrophied rat skeletal muscle. **Physiological reports**, v. 3, 2015.

ZHANG, X., LI, C., FOWLER, S. C., et al. Targeting Heat Shock Protein 70 to Ameliorate c-Jun Expression and Improve Demyelinating Neuropathy. **ACS Chemical Neuroscience**, v.9(2), p.381–390, 2017.

ZILLIOX, L.; RUSSELL, J.W. Treatment of diabetic sensory polyneuropathy. **Curr Treat Options Neurol**, v. 13, p. 143–59, 2011.