

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE –
NÍVEL MESTRADO

LILIAN DE ARAUJO PRADAL

APLICAÇÃO ÚNICA DE CRIOTERAPIA DE IMERSÃO COMO
TRATAMENTO DE GOTA EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR

CASCAVEL-PR

Março/2021

LILIAN DE ARAUJO PRADAL

**APLICAÇÃO ÚNICA DE CRIOTERAPIA DE IMERSÃO COMO
TRATAMENTO DE GOTA EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

ORIENTADOR: Gladson Ricardo Flor Bertolini

CASCADEL-PR

Março/2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

de Araujo Pradal, Lilian

Aplicação única de crioterapia de imersão como tratamento de gota experimental em ratos wistar / Lilian de Araujo Pradal; orientador Gladson Ricardo Flor Bertolini. -- Cascavel, 2021.

65 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências e Saúde, 2021.

1. Gota. 2. Crioterapia. 3. Nocicepção. 4. Modelos animais. I. Ricardo Flor Bertolini, Gladson, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini e à minha coorientadora Dra. Taciane Stein da Silva Leal, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação, que contribuíram imensamente para o meu crescimento e desenvolvimento profissional e pessoal.

À minha amiga Janaína Wolfart, que esteve comigo desde o primeiro dia de mestrado, sempre presente, dos dias mais difíceis aos mais alegres. À Alana, Thaís, Ana Carolina e Luana, que me ajudaram, ensinaram e apoiaram durante estes últimos anos. As amizades construídas com vocês foram a melhor parte da minha vida em Cascavel.

Aos demais professores do programa de mestrado por todo ensinamento e conhecimento compartilhado.

A meus pais, Silvana e Laan e à minha irmã Giovana, por todo amor e carinho, suporte, apoio e orações.

A Deus pela realização deste sonho.

RESUMO

A gota é uma artrite inflamatória caracterizada pela presença de cristais de urato monossódico no espaço peri e intra-articular e está associada à hiperuracemia. O modelo de tratamento tradicional é medicamentoso e nutricional, podendo ser oneroso e apresentar riscos como interação medicamentosa e baixa adesão ao tratamento, enquanto terapias alternativas e coadjuvantes têm se mostrado promissoras. Entretanto, estudos que relacionam a crioterapia no tratamento da gota ainda são escassos. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da crioterapia como forma de tratamento no modelo de gota induzida por cristais de urato em ratos da linhagem Wistar. Para tanto foram utilizados ratos machos, pesando aproximadamente 250 a 300 g, aleatorizados em quatro grupos (n=10), grupo controle (CONT) animais que receberam injeção de tampão fosfato-salino (PBS) e não foram tratados; grupo Gota (GOTA) que receberam injeção de micro cristais e não foram tratados; grupo controle tratamento (CRIO) receberam injeção de solução de PBS e foram tratados; grupo lesão e tratamento (GOTACRIO) que foi induzido à gota e tratado com crioterapia. Os animais do grupo gota foram submetidos à indução pela injeção intra-articular de 50 µL de micro cristais de urato com PBS no joelho direito (1,25 mg), e os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo estresse físico, porém com administração de 50 µL solução de PBS. Os animais foram submetidos a 4 avaliações, sendo a avaliação basal (BASAL), uma avaliação após 7 horas da indução da gota (AV1), imediatamente após tratamento (AV2) e após 1 hora da AV2 (AV3). O tratamento foi realizado em uma única sessão de crioterapia, com duração de 10 minutos e temperatura da água entre 7° C e 10° C. Todos os animais foram avaliados quanto ao limiar nociceptivo, edema articular e força de preensão plantar. Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e foi coletado líquido sinovial da articulação do joelho do membro pélvico direito. Os dados foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel®, e analisados nos programas SPSS® e GraphPad Prism®. O modelo experimental de gota foi eficaz em mimetizar os sinais característicos da doença, com diminuição do limiar de nocicepção, aumento do diâmetro articular, diminuição da força de preensão e alteração no padrão inflamatório sinovial. O protocolo de tratamento com a crioterapia promoveu aumento do limiar de nocicepção ($p < 0,001$), retorno e manutenção da força de preensão ($p < 0,05$), mas não reduziu o edema articular ($p > 0,05$). Na contagem dos leucócitos, os grupos experimentais foram diferentes dos controles ($p < 0,001$), mas iguais estatisticamente entre si ($p = 0,142$) apresentando maior concentração celular. Os resultados sugerem que a crioterapia é eficiente no manejo da nocicepção e retorno da força muscular, podendo ser utilizada como tratamento adjuvante da gota visando à redução das doses do tratamento medicamentoso.

Palavras-Chaves: Gota. Crioterapia. Nocicepção. Modelos animais.

ABSTRACT

**SINGLE APPLICATION OF IMMERSION CRYOTHERAPY IN WISTAR RATS
WITH EXPERIMENTAL GOUT**

Gout is an inflammatory arthritis characterized by the presence of monosodium urate crystals in peri and intra-articular space and is associated with hyperuracemia. The traditional treatment model is drug therapy, which can be costly and presents risks such as drug interaction and poor compliance, while alternative and adjunctive therapies have shown promise. However, studies relating cryotherapy as treatment of gout are still scarce. Therefore, the aim of this research was to evaluate the effect of cryotherapy as a form of treatment in a model of gout induced by urate crystals in Wistar rats. To this end, male rats were used, thinking about 250 to 300 g, randomized into four groups (n=10), control group (CONT) animals that received PBS injection and were not treated; Gout group (GOUT) that received MSUCs injection and were not treated; control treatment group (CRYO) received PBS solution injection and were treated; injury and treatment group (GOUTCRYO) that was induced to gout and treated with cryotherapy. The animals in gout group were induced by intra-articular injection of 50 μ L of micro crystals of urate (MSUCs) in PBS in right knee (1.25 mg), and animals in control group were submitted to the same physical stress but with administration of 50 μ L of PBS solution. The animals were submitted to 4 evaluations, being the basal evaluation (BASAL), an evaluation after 7 hours of the induction of the gout (EV1), immediately after treatment (EV2) and after 1 hour of EV2 (EV3). The treatment was performed in a single cryotherapy session, lasting 10 minutes and water temperature between 7 °C and 10 °C. All animals were evaluated for nociceptive threshold, joint swelling, and plantar grip strength. At the end of the experiment, the animals were euthanized by deep anesthesia and synovial fluid was collected from knee joint of right pelvic limb. Data were tabulated in Microsoft Excel® spreadsheets, and analyzed in SPSS® and GraphPad Prism® software. The experimental gout model was effective in mimicking the characteristic signs of the disease, with decreased nociception threshold, increased joint diameter, decreased grip strength, and altered synovial inflammatory pattern. The cryotherapy treatment protocol promoted increased nociception threshold ($p < 0.001$), return and maintenance of grip strength ($p < 0.05$), but did not reduce joint swelling ($p > 0.05$). In leukocyte count, the experimental groups were different from the controls ($p < 0.001$), but statistically equal to each other ($p = 0.142$) showing higher cell concentration. The results suggest that cryotherapy is efficient in the management of nociception and return of muscle strength, and may be used as adjuvant treatment of gout, aiming to reduce the doses of drug treatment.

Keywords: Gout. Cryotherapy. Nociception. Animal models.

LISTA DE ABREVIATURAS

Quadro 1 – Orientações gerais ao paciente com gota	14
Figura 1 – Esquematização do metabolismo de purinas e urato	16

LISTA DE ABREVIATURAS

MSUCs	Monosodium urate crystals
μMOL	Micro Mol
mg/ml	Miligramas por mililitros
L	Litro
dL	Decilitro
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
DM	Diabetes Mellitus
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroides
USD	Dólar Americano
EULAR	European League Against Rheumatism
IASP	Associação Internacional para Estudos da Dor
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
LCD	Display de Cristal Líquido
TNF	Fator de Necrose Tumoral
°C	Graus Celsius
GC	Grupo Controle
GG	Grupo Gota
GCC	Grupo Controle Crioterapia
GGC	Grupo Gota Crioterapia
IL	Interleucina

LELRF	Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos
+	Mais
±	Mais ou menos
m	Metros
μL	Microlitros
μm	Micrômetro
mg/Kg	Miligramas por quilo
mm	Milímetros
n	Número
%	Por cento
pH	Potencial hidrogeniônico
®	Registro
SPSS	Software de análise estatística
TEP	Tempo de Elevação da Pata
x	Vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8 - 10
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Gota.....	12
3.2 Fisiopatologia da gota	15
3.3 Crioterapia.....	17
3.4 A atuação da crioterapia na gota.....	18
4. REFERÊNCIAS	20
5. ARTIGO CIENTÍFICO	34
6. ANEXOS	36
Aprovação no comitê de ética	37
Normas da revista.....	42

1. INTRODUÇÃO

A gota é uma forma de artrite inflamatória que se caracteriza pela deposição de cristais de urato monossódico (*monosodium urate crystals – MSUCs*) no espaço peri e intra-articular que está associado à hiperuracemia (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; SANTOS, 2016). Os sinais clínicos da gota ocorrem como resultado da resposta inflamatória aos MSUCs (PEREZ-RUIZ; CASTILLO, 2014; DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016).

Em humanos, ao contrário do que ocorre com a maioria dos mamíferos, o ácido úrico, resultante do metabolismo da purina, não passa pela degradação oxidativa, o que somado à alimentação incorreta e à reabsorção do urato, elevam o nível sérico deste, desencadeando no acúmulo nas articulações (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005). O ácido úrico e os cristais de urato são adjuvantes na indução do processo inflamatório pelo estímulo da liberação de mediadores como interleucinas 1 β , IL-6 e IL-8 e fatores de necrose tumoral (TNF- α) (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005; SANTOS, 2016; HASLERUD *et al.*, 2016). O processo inflamatório agudo ocorre imediatamente à agressão, sendo uma resposta rápida ao estímulo, com resolução e retorno à homeostase, porém, com a persistência do estímulo, há a inflamação crônica (RAHTES *et al.*, 2018). No caso da gota, uma de suas características é a oscilação entre a cronicidade e sua agudização periódica (SANTOS, 2016).

Dados epidemiológicos do Reino Unido e Nova Zelândia apontam a alta prevalência da gota, atingindo 2,8 por mil pessoas por ano nos anos 2000, enquanto nos Estados Unidos a prevalência foi estimada em 3,9% em 2008 (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; SANTOS, 2016). Quanto aos fatores de risco, 53% dos portadores de gota são obesos (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016). Outras comorbidades também estão relacionadas, como hipertensão arterial sistêmica (HAS) (74%), diabetes mellitus (DM) (26%), doenças renais (71%) (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016), o que indica uma forte relação entre gota e doenças metabólicas (RODDY; MALLIN; DOHERTY, 2013).

O tratamento desta doença necessita de uma abordagem sistêmica, para a gota diretamente, mas também para seus fatores de risco e comorbidades presentes,

sendo este complexo, por vezes oneroso e passível de interações medicamentosas (KHANNA *et al.*, 2012).

O objetivo do tratamento em pacientes com gota visa melhorar a qualidade de vida, tem como padrão a terapia medicamentosa com drogas antiúricas, corticóides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; KHANNA *et al.*, 2012; RODDY; MALLEN; DOHERTY, 2013; QASEEM, 2017; FINCH; KUBLER, 2016). Entretanto, o *American College of Physicians* (2017), o *American College of Rheumatology* (2012) e a *European League Against Rheumatism* (2017) indicam a necessidade de um tratamento medicamentoso em conjunto com terapias alternativas como necessários ao controle desta doença e melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Modelos alternativos de tratamento de gota têm se mostrado promissores (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016) sendo um deles a crioterapia, já utilizada no tratamento de osteoartrite e artrite reumatóide por seus efeitos de analgesia, vasoconstrição, miorelaxamento, anti-inflamatório e antioxidativo (GUILLOT *et al.*, 2014). Este tratamento tem se mostrado eficaz, de baixo custo e fácil utilização, porém estudos abordando a efetividade da crioterapia como tratamento para a gota são escassos (MARTINS *et al.*, 2016; GUILLOT *et al.*, 2014).

Portanto, são necessários estudos que proponham métodos não farmacológicos eficientes que visem a preencher lacunas e apontar novos tratamentos, como a crioterapia, minimizando os efeitos colaterais das medicações e os efeitos deletérios da doença (ASSIS *et al.*, 2016; KHANNA *et al.*, 2012) para o desenvolvimento de novos protocolos que auxiliem no retorno, promoção e manutenção da qualidade de vida da população afetada pela gota.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a crioterapia como forma de tratamento para o aumento do estímulo nociceptivo e a inflamação presente na gota induzida experimentalmente em ratos Wistar.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da crioterapia sobre as características de nocicepção, edema e força muscular em ratos Wistar pós indução da gota experimental;
- Avaliar perfil inflamatório sinovial de articulação tíbio-femoral com o modelo experimental de gota antes e após tratamento com crioterapia;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Gota

A gota é considerada uma artrite que ocorre devido ao depósito de cristais de urato monossódico nas articulações sinoviais, nos espaços peri e intra-articular, relacionada à hiperuracemia (WINNARD *et al.*, 2012; DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; SANTOS, 2016). Sendo uma das mais recorrentes doenças inflamatórias das articulações, com impactos de morbidade e mortalidade precoce (KUO *et al.*, 2015).

A sua origem está relacionada à hiperuracemia (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005; DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; SANTOS, 2016), entretanto estudos demonstram a relação da gota com algumas comorbidades e síndromes metabólicas, como Santos (2016) que aponta a obesidade como um dos maiores fatores de risco, devido à baixa excreção de ácido úrico e maior retenção de purinas. Outras comorbidades e síndromes metabólicas relacionadas são dislipidemias, resistência à insulina, DM, HAS, doenças cardiovasculares, doenças renais crônicas (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; WINNARD *et al.*, 2012; RODDY; MALLEEN; DOHERTY, 2013). Outros fatores de risco são: sexo masculino (devido ao metabolismo e excreção do urato pelos hormônios estrogênicos femininos), estilo de vida, dietas ricas em carnes vermelhas, frutos do mar e peixes (devido a suas concentrações de purinas) (RODDY; MALLEEN; DOHERTY, 2013), consumo de álcool (devido seu metabolismo induzir à hiperuracemia e reduzir a excreção de urato) (SANTOS, 2016). Entretanto, o mecanismo destes alimentos em relação à gota ainda não está plenamente esclarecido (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016).

Epidemiologicamente, a gota tem alta prevalência em países como Nova Zelândia e Reino Unido, afetando 7% da população masculina acima dos 75 anos (RODDY; MALLEEN; DOHERTY, 2013), 2,5% da população total da Europa (RICHETTE *et al.*, 2017), e quase 4% dos estadunidenses, somando milhões de

indivíduos (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016). No Brasil, ainda há carência de informações epidemiológicas relacionadas à gota (AZEVEDO *et al.*, 2017).

Os sinais clínicos da gota se manifestam como resultado da resposta inflamatória aos MSUCs, quando os níveis séricos de ácido úrico excedem os valores de 380 $\mu\text{mol/L}$, ou 0,02mg/dL, cristais de urato começam a se formar e a se depositar nas regiões peri e intra-articulares, sendo usualmente, monoarticular e acometendo principalmente membros pélvicos, em especial a articulação da primeira falange metatársica (RODDY; MALLEEN; DOHERTY, 2013).

Os MSUCs têm a habilidade de iniciar, amplificar e sustentar o processo inflamatório da gota por sua capacidade de estimular respostas humorais e mediadores inflamatórios celulares (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005). O progresso do processo inflamatório intensifica-se com o aumento da permeabilidade vascular local, ou seja, periarticular, seguido da chegada de células do sistema imune a esta articulação, como células mononucleares, macrófagos ativados, células dendríticas, mastócitos e linfócitos, citocinas, proteases, radicais livres e outros fatores pró-inflamatórios envolvidos geram uma resposta que favorece o dano tecidual local e a manifestação do quadro clínico da gota, com perda de tecido cartilaginoso e erosão óssea (HEO *et al.*, 2017; KOURILOVITCH; GALARZA-MALDONADO; ORTIZ-PRADO, 2014; CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005).

O quadro clínico possui sintomas locais de uma artrite aguda, como dor, hiperemia, hipertermia, edema e perda da função, com pico de dor de aproximadamente 6 a 8 horas, que geralmente se inicia durante o período noturno (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; DESAI; STEIGER; ANDERS, 2017). Há algumas variações de acordo com as fases da gota em cada paciente, pois segundo Dalbeth *et al.* (2016), a gota possui quatro fases, sendo (1) hiperuracemia sem a formação de MSUCs e assintomática; (2) deposição de MSUCs periarticular, porém ainda assintomática; (3) deposição de MSUCs intra-articulares com presença de sinais inflamatórios e, por fim, (4) gota avançada: caracterizada pela formação de tofos formados pela compressão de MSUCs, tecidos adjacentes e células de defesa mortas (DESAI; STEIGER; ANDERS, 2017).

O tratamento é composto principalmente por terapia medicamentosa e consensual, é bastante semelhante o que se sugere no *Guideline da American College of Physicians* (2012; 2017) às recomendações da EULAR (2016). Este tratamento tem como principal objetivo o rápido alívio da dor e diminuição do edema, tendo como

principais componentes, AINEs e a colchicina, sem evidências que comprovem uma maior eficácia de um sobre o outro. A colchicina é um alcaloide inibitório da fagocitose leucocitária de MSUCs e mediadores inflamatórios (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016).

O *American College of Physicians*, em 2017, estimava um gasto anual de aproximadamente 1 bilhão USD com tratamento medicamentoso e ambulatorial aos pacientes com gota nos Estado Unidos (QASEEM *et al.*, 2017). As medicações utilizadas no tratamento da gota ainda apresentam risco de toxicidade renal e gastrointestinal, devido à possibilidade de sinergismo dos fármacos, muitas vezes utilizados em conjunto para o manejo dos sintomas (KHANNA *et al.*, 2012).

Além do custo financeiro do tratamento, a gota traz grande prejuízo aos seus portadores pela diminuição e perda da funcionalidade dos membros afetados e, conseqüentemente, redução da qualidade de vida (KHANNA *et al.*, 2012; QASEEM *et al.*, 2017), pois apesar de crises intermitentes, a agudização da gota é apontada como uma experiência muito dolorosa (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005).

Há ainda o tratamento composto por terapias comportamentais, em conjunto com a abordagem farmacológica, que é indicado ao paciente com gota pelo *Guideline do American College of Rheumatology* (2012) pois promove a autonomia e o autogerenciamento pelo paciente, baseado em hábitos de vida e alimentares, conforme o quadro 1.

Evitar	Limitar	Encorajar
Miúdos ricos em purinas (rins e fígado)	Pequenas porções de: Carnes bovinas, de cordeiro e porco Frutos do mar com alto teor de purinas (mariscos e sardinha)	Laticínios semidesnatados ou desnatados
Alimentos e bebidas adoçados com xarope de milho	Suco de frutas com adoçantes naturais Açúcar refinado e sobremesas adocicadas Alimentos ricos em sal, como temperos prontos	Vegetais
Abuso de álcool, principalmente durante as crises de gota	Bebidas alcóolicas, principalmente cervejas	

Quadro demonstrativo das orientações quanto à dieta aos pacientes com gota, apresentando os alimentos a serem evitados, limitados ou encorajados em seu consumo. Adaptado de Khanna et al. (2012).

3.2. Fisiopatologia da gota

A gota, como anteriormente citado, é um tipo de artrite inflamatória, acionada pela cristalização do ácido úrico nas articulações, frequentemente associada à hiperuracemia, com crises geralmente intermitentes, constituindo uma das piores experiências dolorosas relatadas (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005; FINCH; KUBLER, 2016).

Na maioria dos peixes, anfíbios e mamíferos não primatas, o ácido úrico gerado pelo metabolismo da purina sofre degradação oxidativa por meio da enzima uricase, produzindo um composto mais solúvel e de fácil excreção, enquanto em humanos, o gene da uricase é afetado por duas mutações, que causa prematuridade dos códons de parada de transcrição (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005; PEREZ-RUIZ; CASTILLO, 2014; FINCH; KUBLER, 2016).

A excreção do ácido úrico ocorre pela via renal, responsável por dois terços da excreção, e pela via intestinal (PEREZ-RUIZ; CASTILLO, 2014). A ausência de uricase funcional e a reabsorção do filtrado de urato pelos rins, resulta na elevação

do nível de urato no plasma em até dez vezes mais no ser humano em relação a outros mamíferos (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005).

Outro fator, a ingestão de purina, pois seu metabolismo gera precursores de urato, a hipoxantina, transformada em xantina que, após ser oxidada, torna-se urato (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005; SANTOS, 2016) como observado na Figura 1, a seguir, que é possível verificar à esquerda, a elevada produção de urato pela degradação da purina pelo fígado. Quanto aos rins, secreção e reabsorção coexistem ao longo dos túbulos renais proximais e cerca de apenas 10% do urato filtrado é então excretado, sendo a baixa excreção de urato a causa dominante da hiperuracemia (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016). Ao centro da figura, componentes do metabolismo renal e reabsorção do urato neste ciclo.

Figura 1: Exemplificação dos metabolismos da purina e urato na fisiopatologia da gota

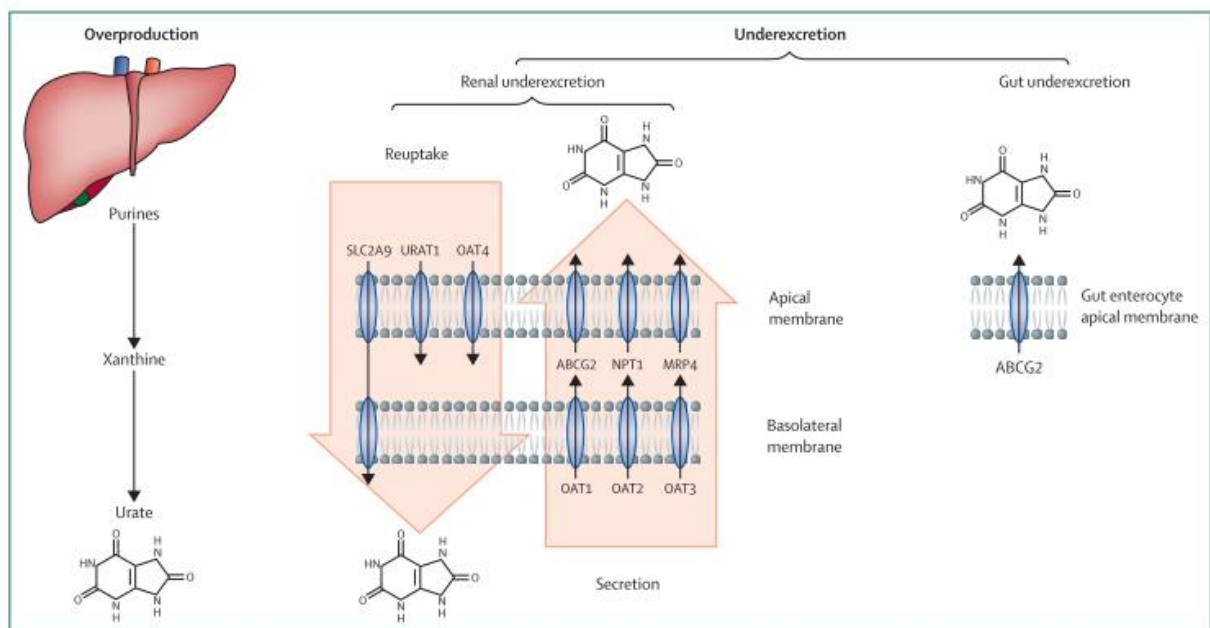


Ilustração do mecanismo da hiperuricemia. À esquerda, a superprodução hepática de urato pela via de degradação da purina em xantina e então urato é um contribuinte para as concentrações séricas. A subexcreção de urato é a principal causa de hiperuricemia. No centro, a esquematização do processamento do urato no túbulo proximal renal, onde após a excreção ocorre a recaptação de urato da urina filtrada. À direita, no intestino, variantes da proteína de membrana ABCG2 com função reduzida contribuem para a subexcreção do urato. Adaptado de Dalbeth; Merriman; Stamp (2016).

Os níveis de urato sofrem ainda interferência de fatores como temperatura, pH, concentração de cátions, que elevam a sua concentração, sendo estes fatores uma

das explicações para a articulação metatarso-falangeana ser comumente afetada (temperatura inferior ao restante do corpo) (SANTOS, 2016).

Portanto, na persistência da hiperuracemia, alguns pacientes com gota desenvolvem ainda tofos e erosão da articulação afetada, este último sintoma difere a gota das artrites autoimunes, pois a erosão óssea da gota ocorre pela deposição dos MSUCs e células de defesa do sistema imune que ainda são os formadores do tofos (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; DESAI; STEIGER; ANDERS, 2017).

Células do sistema imune inato e adaptativo, como macrófagos, mastócitos, células T e B são encontradas no espaço peri e intra-articular, sendo os macrófagos as principais células do processo de erosão óssea na gota, pois MSUCs induzem estas células à liberação de prostaglandina E2 (PGE2) e IL-1 β que estimula a ativação e diferenciação de osteoclastos, propiciando, então, a erosão (McQUEEN; CHHANA; DALBETH, 2012)

A IL-1 β liberada por intermédio do complexo proteico intracelular NALP3, por sua vez ativado pela exposição a elementos microbiológicos, como os MSUCs, ocorrendo em seguida, o influxo de neutrófilos, processo que ocorre com grande semelhança entre humanos e ratos (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016), animais de experimentação deste estudo. Ocorre ainda a ativação de células de defesa menos diferenciadas, com a síntese de fator de necrose tumoral TNF- α , em conjunto com a fagocitose dos macrófagos, que leva à indução de outras interleucinas, como a IL-6 e IL-8, potencializando a cascata inflamatória (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005).

Dentre as principais citocinas e quimiocitocinas presentes no líquido sinovial, o TNF α e a interleucina 6, participantes da fisiopatologia da gota, induzem o agravamento da resposta inflamatória, estimulando o acúmulo de células imunológicas e endoteliais dentro do compartimento articular, formando assim uma resposta inflamatória e destrutiva, com sinovite, perda de tecido cartilaginoso e erosão óssea, levando à cronicidade da doença (SMOLEN; ALETAHA; McINNIS, 2016; ANQUETIL *et al.*, 2015; CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005).

3.3. Crioterapia

A crioterapia é definida como a aplicação terapêutica de qualquer substância que remova o calor do corpo, diminuindo a temperatura dos seus tecidos (MARTINS *et al.*, 2016). As modalidades de aplicação de crioterapia variam em efetividade, facilidade de uso e custos (SCHELESINGER *et al.*, 2002) e a imersão em água fria é um dos métodos mais comuns e efetivos (MARTINS *et al.*, 2016) devido à sua capacidade de vasoconstrição local mais abrangente levar a redução da propagação de fluídos intersticiais (FURTADO *et al.*, 2018).

Pesquisas anteriores revelaram que a crioterapia tem efeito antioxidante, reduz o estresse oxidativo, diminui os níveis de biomarcadores pró-inflamatórios, como IL-1 β e TNF- α (HASLERUD *et al.*, 2016; SCHELESINGER *et al.*, 2002; FURTADO *et al.*, 2018), devido à indução de vasoconstrição, redução do fluxo sanguíneo e taxa metabólica, com influência sobre o processo inflamatório e sobre a dor (MARTINS *et al.*, 2016).

Quanto ao processo inflamatório, quando há uma lesão, ocorre o aumento da demanda por oxigênio das células para suas funções regenerativas e a limitação na oferta do oxigênio contribui para a liberação de radicais livres, afetando as funções mitocondriais. A crioterapia apresenta um efeito protetor dos tecidos por meio da diminuição das taxas metabólicas (FREIRE; GEREMIA; BARONI, 2016).

Nas injúrias, as células afetadas ativam a liberação de quimiocitocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , que ativam enzimas como hidrolases, fosfolipases, proteases que iniciam uma cascata inflamatória, atraindo células do sistema imune como neutrófilos e macrófagos que, por suas ações oxidativas, promovem a liberação de mais citocinas, maior migração de células de defesa e aumento da produção de radicais livres, com piora do quadro inflamatório (FREIRE; GEREMIA; BARONI, 2016).

Segundo Furtado *et al.* (2018), a crioterapia leva à melhora do processo inflamatório pela estimulação da atividade da acetilcolina (ACh), pois diminui a atividade da acetilcolinesterase (AChE), devido à característica termodinâmica da AChE. A ACh é inibidora da TNF- α e IL-1 β , levando à redução da inflamação e melhora do quadro clínico (FURTADO *et al.*, 2018).

Quanto à dor, a crioterapia apresenta efeitos analgésicos, tanto locais como no nível de medula espinhal, pois diminui a temperatura da pele e tecidos subjacentes de 2 a 4 cm, reduzindo o limiar de ativação dos nociceptores teciduais e a velocidade de condução dos sinais nervosos da dor, inibindo a transmissão destes para o corno posterior da medula espinhal, atuando ainda como estimulante contra-irritante pelas vias centrais da dor, que então ativam vias descendentes inibitórias, bloqueando a transmissão da dor ao cérebro (NADLER; WEINGAND; KRUSE, 2014; KARVAT *et al.*, 2018; ALGAFLY; GEORGE, 2007).

3.4. A atuação da crioterapia na gota

Os avanços recentes na ciência e o progresso na imunologia promoveram o surgimento de novos alvos terapêuticos e novas drogas que, entretanto, permanecem com custo elevado em sua maioria, com raros, porém potenciais, riscos à saúde por seus efeitos colaterais diversos e pela toxicidade por uso prolongado de AINEs e corticoides, tratamentos tradicionais da gota (GUILLOT *et al.*, 2014). Portanto, o desenvolvimento de terapias alternativas e adjuntas ao tratamento medicamentoso que possibilitem a redução das doses destas drogas e a diminuição de seus riscos biológicos é fundamental (GUILLOT *et al.*, 2014; HUI *et al.*, 2017).

A crioterapia tem sido utilizada empiricamente no tratamento das artrites e doenças reumáticas com foco em suas sintomatologias, devido a seus efeitos de analgesia, vasoconstrição, redução de fluxo sanguíneo e taxa metabólica, por meio do resfriamento das articulações e tecidos adjacentes (GUILLOT *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016; SCHLESINGER *et al.*, 2002).

A gota, como citado anteriormente, devido aos MSUCs, estimula monócitos e macrófagos a produzirem a IL-1 β que dispara a cascata imunológica do processo inflamatório até a síntese de TNF- α e indução de outras interleucinas, como IL-6 e IL-8 (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005), enquanto a crioterapia possui efeito antiacetilcolinesterásico, pela sensibilidade térmica da enzima AChE, estimulando a ACh, inibidora da IL-1 β e TNF- α , interrompendo assim o progresso do processo inflamatório das articulações

envolvidas e promovendo a melhora do quadro clínico e alívio da sintomatologia da gota (FURTADO *et al.*, 2018).

Além do alívio dos sintomas pela redução do processo inflamatório, a crioterapia atua na fisiologia da dor envolvida na gota, uma das principais queixas relacionadas a esta disfunção devido a sua intensidade (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005). A crioterapia tem ação sobre a medula espinhal, reduzindo o limiar de ativação dos nociceptores teciduais, pelo resfriamento da pele e tecidos adjacentes, e na redução da velocidade de condução dos sinais nervosos de nocicepção (NADLER; WEINGAND; KRUSE, 2014; KARVAT *et al.*, 2018; ALGAFLY; GEORGE, 2007).

Para este estudo, a escolha do rato como animal de experimentação foi pelo fato deste apresentar estrutura e resposta a lesões semelhantes aos humanos (SAVASTANO *et al.*, 2014; KARVAT *et al.*, 2016).

REFERÊNCIAS

ALGAFLY, A. A.; GEORGE, K. P. The effect of cryotherapy on nerve conduction velocity, pain threshold and pain tolerance. **British Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 6, p. 365–369, 2007.

ANQUETIL, F.; CLAVEL, C.; OFFER, G.; SERRE, G.; SEBBAG, M. IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 3664-3674, 2015.

ASSIS, L. et al. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 1, p. 169–177, 2016.

AZEVEDO, V. F.; LOPES, M. P.; CATHOLINO, N. M.; et al. Revisão crítica do tratamento medicamentoso da gota no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 4, p. 346–355, 2017.

CHOI, H. K.; MOUNT, D. B.; REGINATO, A. M. Pathogenesis of Gout. **Annals of Internal Medicine**, v. 143, n. 2, p. 499–516, 2005.

DALBETH, N.; MERRIMAN, T. R.; STAMP, L. K. Gout. **The Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2039–2052, 2016.

DESAI, J.; STEIGER, S.; ANDERS, H.-J. Molecular Pathophysiology of Gout. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 8, p. 756–768, 1 ago. 2017.

FINCH, A.; KUBLER, P. The management of gout. **Australian Prescriber**, v. 39, n. 4, p. 119–122, 1 ago. 2016.

FREIRE, B.; GEREMIA, J.; BARONI, B. M. Effects of cryotherapy methods on circulatory , metabolic , inflammatory and neural properties : a systematic review. **Fisioterapia em Movimento**, v. 29, n. June, p. 389–398, 2016.

FURTADO, A. B. V. et al. Cryotherapy: Biochemical alterations involved in reduction of damage induced by exhaustive exercise. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 11, p. 1–8, 2018.

GUILLOT, X. et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: A systematic review. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, n. 2, p. 281–294, 2014.

HASLERUD, S. *et al.* Low-Level Laser Therapy and Cryotherapy as Mono- and Adjunctive Therapies for Achilles Tendinopathy in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 1, p. 32–42, 14 set. 2016.

HEO, R. et al. Dextran sulfate nanoparticles as a theranostic nanomedicine for rheumatoid arthritis. **Biomaterial**, v. 131, p. 15-26, 2017.

HUI, M. et al. The British society for rheumatology guideline for the management of gout. **Rheumatology** (United Kingdom), v. 56, n. 7, p. 1056–1059, 2017.

KARVAT, J. et al. Evaluation of nociception and edema in experimental sciatic nerve compression model in Wistar rats treated with cryotherapy. **Revista Dor**, v. 17, n. 3, p. 210–214, 2016.

KARVAT, J. et al. Crioterapia em modelo de compressão do nervo isquiático: análise funcional e morfológica. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 24, n. 1, p. 54–59, 2018.

KHANNA, D. et al. American college of rheumatology guidelines for management of gout. part 1: Systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. **Arthritis Care and Research**, v. 64, n. 10, p. 1431–1446, 2012.

KHANNA, D. et al. American college of rheumatology guidelines for management of gout. part 2: Therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis. **Arthritis Care and Research**, v. 64, n. 10, p. 1447–1461, 2012.

KOURILOVITCH, M.; GALARZA-MALDONADO, C.; ORTIZ-PRADO, E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 48–49, p. 26–30, 2014.

KUO, C. F. et al. Familial aggregation of gout and relative genetic and environmental contributions: A nationwide population study in Taiwan. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 2, p. 369–374, 1 fev. 2015.

MARTINS, C. N. et al. Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats. **Physiotherapy** (United Kingdom), v. 102, n. 4, p. 377–383, 2016.

MCQUEEN, F. M.; CHHANA, A.; DALBETH, N. Mechanisms of joint damage in gout: Evidence from cellular and imaging studies. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 173–181, 2012.

NADLER, S. F.; WEINGAND, K.; KRUSE, R. J. The Physiologic Basis and Clinical Applications of Cryotherapy and Thermotherapy for the Pain Practitioner. **Pain Physician**, v. 7, n. 3, p. 395–399, 2004.

PEREZ-RUIZ, F.; CASTILLO, E. Physiopathology of gout. **Managing Gout in Primary Care**. [S.l.]: Springer Healthcare, 2014. p. 13–24.

QASEEM, A. et al. Management of acute and recurrent gout: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. **Annals of Internal Medicine**, v. 166, n. 1, p. 58–68, 3 jan. 2017.

RAHTES, A; GENG, S; LEE, C; LI, L. Cellular and molecular mechanisms involved in the resolut of innate leukocyte inflammation. **Jounal leukoc Biological**, p. 1-7, 2018.

RICHETTE, P. et al. 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. **Annals of the Rheumatic Diseases**. [S.l.]: BMJ Publishing Group. , 2017.

RODDY, E.; MALLEEN, C. D.; DOHERTY, M. Gout. **British Medical Journal**, v. 347, n. October, p. 179–195, 2013.

SANTOS, F. Gota: uma revisão. **Revista Médica da UFPR**, v. 3, n. 1, p. 25–31, 2016.

SAVASTANO, L. E. et al. Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 227, p. 166–180, 2014.

SMOLEN, J. S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: Recommendations of an international task force. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 4, p. 631–637, 2010.

WINNARD, D. et al. National prevalence of gout derived from administrative health data in aotearoa New Zealand. **Rheumatology**, v. 51, n. 5, p. 901–909, 2012.

ARTIGO CIENTÍFICO

**APLICAÇÃO ÚNICA DE CRIOTERAPIA POR IMERSÃO EM RATOS
WISTAR COM GOTA EXPERIMENTAL**

JOURNAL OF THERMAL BIOLOGY

APLICAÇÃO ÚNICA DE CRIOTERAPIA POR IMERSÃO EM RATOS WISTAR COM GOTA EXPERIMENTAL

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) - Campus Cascavel, Paraná,
Brasil

Lilian de Araujo Pradal¹, Alana Ludemila de Freitas Tavares², Thaís Caroline Schnauffer², Iranilda Moha², Taciane Stein da Silva Leal³, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro⁴, Gladson Ricardo Flor Bertolini⁴

1 Enfermeira formada pela UEL e mestranda em Biociências e Saúde pela UNIOESTE, Cascavel, PR - Brasil

2 Fisioterapeutas mestrandas em Biociências e Saúde pela UNIOESTE, Cascavel, PR – Brasil

3 Fisioterapeuta pós-doutoranda em Biociências e Saúde pela UNIOESTE, Cascavel, PR – Brasil

4 Professores doutores na UNIOESTE, Cascavel, PR - Brasil

Laboratórios de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos e de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) - Campus Cascavel.

Autor responsável: Gladson Ricardo Flor Bertolini

Endereço eletrônico: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Endereço para correspondência: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Rua Universitária, 2069 / Clínica de Fisioterapia, JD Universitário
85819110 - Cascavel, PR – Brasil

Conflito de interesse e agências financiadoras

Não há conflitos de interesse. A pesquisa foi realizada com financiamento próprio dos autores e recursos da universidade.

RESUMO

A gota é uma artrite inflamatória, associada à hiperuracemia, caracterizada pela presença de cristais de urato monossódico no espaço peri e intra-articular e terapias alternativas têm se mostrado promissoras em seu tratamento. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da crioterapia como forma de tratamento no modelo de gota em ratos da linhagem Wistar. Foram utilizados ratos machos, aleatorizados em quatro grupos: grupo controle (CONT), grupo gota sem tratamento (GOTA), grupo controle mais tratamento (CRIO) e um grupo gota com tratamento (GOTACRIO). Os animais dos grupos gota foram submetidos à indução por injeção intra-articular de 50 μ L de Micro Cristais de Urato em joelho direito (1,25 mg). O tratamento foi realizado em uma única sessão de crioterapia com duração de 10 minutos e a temperatura da água entre 7 e 10° C. O modelo experimental foi eficaz em mimetizar os sinais característicos da gota, como diminuição no limiar nociceptivo, aumento do diâmetro articular, diminuição de força de preensão e alterações de perfil inflamatório sinovial. A crioterapia promoveu aumento do limiar de nocicepção em relação aos controles ($p < 0,001$) e retorno e manutenção da força muscular ($p < 0,05$), mas não foi efetiva contra os demais efeitos deletérios da gota avaliados. Na contagem de leucócitos, os grupos experimentais foram diferentes dos controles ($p < 0,001$), mas estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que a crioterapia é eficaz no manejo da nocicepção e força muscular, podendo ser utilizada como tratamento complementar da gota.

Palavras-Chaves: Gota. Crioterapia. Nocicepção. Modelos animais.

INTRODUÇÃO

A gota é uma forma de artrite inflamatória que se caracteriza pela deposição de cristais de urato monossódico (*monosodium urate crystals* – MSUCs) no espaço peri e intra-articular que está associado à hiperuracemia (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; SANTOS, 2016). Os sinais clínicos da gota ocorrem como resultado à hiperuracemia, que é considerada patológica quando o nível sérico de ácido úrico é de 408µmol/L ou 6,8mg/dL (PEREZ-RUIZ; CASTILLO, 2014; KHANNA *et al.*, 2012).

Os MSUCs estimulam monócitos e macrófagos a produzirem IL-1β, ocorrendo em seguida o influxo de neutrófilos (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016). Dentre as principais citocinas e quimiocitocinas presentes no líquido sinovial, o TNFα e a interleucina 6 estimulam o acúmulo de células imunológicas e endoteliais dentro do compartimento articular, formando assim uma resposta inflamatória e destrutiva, com sinovite, perda de tecido cartilaginoso e erosão óssea, levando à cronicidade da doença (SMOLEN; ALETAHA; McINNES, 2016; ANQUETIL *et al.*, 2015; CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005).

O tratamento da gota visa a melhorar a qualidade de vida e, tem como padrão a terapia medicamentosa, com drogas antiúricas, corticóides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), sendo os mais citados o alopurinol, prednisona e a colchicina (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016). Entretanto, o *American College of Physicians* (2017), o *American College of Rheumatology* (2012) e a *European League Against Rheumatism* (2017) indicam a necessidade de um tratamento medicamentoso em conjunto com bons hábitos alimentares, atividades físicas e terapias alternativas.

Modelos alternativos de terapias ao tratamento de gota têm se mostrado promissores (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016), sendo um deles, a crioterapia, por seus efeitos de analgesia, vasoconstrição, miorelaxamento, anti-inflamatório e antioxidativo (GUILLOT *et al.*, 2014). Este tratamento tem se mostrado eficaz, de baixo custo e de fácil utilização em casos de artrite reumatoide e lesões musculares, porém estudos abordando a efetividade da crioterapia como tratamento para a gota são escassos (MARTINS *et al.*, 2016; GUILLOT *et al.*, 2014).

Sendo necessários estudos que proponham métodos não farmacológicos eficientes para a gota, que visem preencher lacunas e apontar novos tratamentos e, para o desenvolvimento de novos protocolos que auxiliem no retorno, promoção e manutenção da qualidade de vida da população afetada, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da crioterapia sobre as características de nocicepção, edema e força muscular e, ainda, analisar o perfil inflamatório sinovial de articulação tíbio-femoral em modelo experimental de artrite gotosa em ratos Wistar.

METODOLOGIA

Animais

O estudo é do tipo experimental, randomizado, composto por grupo amostral de 32 machos da linhagem *Wistar*, com idade de 12 semanas, obtidos no Biotério Central da Unioeste. Estes foram mantidos em caixas plásticas de polipropileno, com acesso a água e ração *ad libitum*, temperatura controlada de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo claro/escuro de 12 horas. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Unioeste protocolo número 20-19.

Os animais foram separados em quatro grupos aleatoriamente, sendo: CONT: Grupo controle (n=8): composto por animais que receberam injeção intra-articular de veículo (50 μL ; PBS) e não receberam tratamento. GOTA: Grupo gota (n=8): composto pelos animais que receberam a injeção intra-articular de MSUCs (50 μL ; 1,25 mg) e não receberam nenhum dos tratamentos. CRIO: Grupo controle crioterapia (n=8): composto por animais que receberam a injeção intra-articular de veículo (50 μL ; PBS) e foram tratados com crioterapia. GOTACRIO: Grupo gota crioterapia (n=8): foi composto por animais que receberam injeção intra-articular MSUCs (50 μL ; 1,25 mg) e foram tratados com a crioterapia.

Modelo experimental da gota induzida por MSUCs

O modelo experimental de indução da gota foi realizado como o descrito por Coderre *et al.* (1987). Foram utilizadas as seguintes substâncias: Ácido úrico (4g,

Sigma-aldrich EUA); PBS (800mL, LABEF-UNIOESTE); solução isotônica de cloreto de sódio (0,9 %, Aster ®), álcool iodado (1%, Rialcool ®).

Os cristais de urato monossódico foram produzidos no LABEF, respeitando o protocolo: 4g de ácido úrico foram dissolvidos em 800 ml de PBS, com pH ajustado para 8,9. Essa diluição permaneceu *overnight* em estufa aquecida a 50 °C até completa evaporação da diluição. O produto resultante foram os cristais MSUCs que foram suspensos em PBS, pH 7,4, para posterior injeção na articulação tibiofemoral direita. Os animais receberam 1,25 mg de MSUCs suspenso em 50 µL de PBS (50 µL; 1,25 mg - Grupo GOTA e GOTACRIO) ou apenas o veículo (50 µL Grupo CONT e CRIO).

Para a injeção intra-articular de MSUCs ou PBS, os animais foram contidos manualmente e com o auxílio de uma flanela, a área anterior da articulação tibiofemoral do membro pélvico direito foi tricotomizada e realizada antissepsia com álcool iodado (1%). Em seguida houve a realização da injeção com auxílio de uma seringa de 1 ml e agulha 13 x 4.5 mm.

Avaliações Funcionais

Prévio à indução da gota experimental, os animais foram treinados e adaptados aos equipamentos. Realizadas avaliações nos seguintes momentos: uma avaliação basal (Basal) realizada antes da aplicação das substâncias na cápsula intra-articular. O segundo momento da avaliação ocorreu 7 horas após a indução da gota, anterior ao início do tratamento, e foi denominada de AV1 (Avaliação 1). No mesmo dia, imediatamente após o tratamento com a crioterapia, a AV2. 1 hora após a AV2 foi realizada a AV3. Ao término das avaliações os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico.

Avaliação da nocicepção

Para avaliação do limiar nociceptivo, foi utilizado um analgesímetro digital, tipo filamento de Von Frey (Insight®, Ribeirão Preto, São Paulo). O animal foi mantido em uma caixa elevada com piso de tela, assim a ponta de polipropileno do filamento era

posicionada de forma perpendicular na região plantar do membro pélvico direito, com uma pressão crescente até que o animal retirasse o membro. Em cada avaliação houve três repetições do teste e foi utilizado o valor médio. O teste foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador. Os dados são expressos em gramas (g) (DUTTA *et al.*, 2018).

Mensuração do edema articular

O edema articular foi quantificado através da medida do diâmetro articular fêmuro-tibial em eixo médio-lateral com auxílio de um paquímetro não digital com retorno automático e o resultado expresso em milímetros (mm), conforme descrito por Bressan, Cunha e Tonussi (2006). Para realização da avaliação, os animais foram gentilmente imobilizados em uma flanela, foram realizadas 3 medidas em cada animal, sendo utilizada a média das mensurações.

Força de preensão

Para a avaliação da força muscular de preensão, foi utilizado um transdutor de força (*Insigth®*, Ribeirão Preto, São Paulo), como o descrito por Bertelli e Mira (1995). Nesta avaliação, o animal era posicionado de modo que agarrasse uma barra conectada ao transdutor de força com o membro pélvico direito, sendo então tracionado pela mão do experimentador para trás, com força crescente até que a preensão fosse perdida, momento em que o aparelho fornece a mensuração da força exercida pelo animal. O membro pélvico contralateral permanecia imobilizado pela mão do experimentador para evitar interferências nas avaliações. Foram realizadas três avaliações com utilização da média destas. Valor expresso em gramas (g).

Protocolo de tratamento

Para a realização do tratamento com crioterapia, foi utilizado um recipiente adaptado com uma abertura em sua tampa, por onde foi inserido o membro pélvico do animal. O recipiente continha água e gelo, e a temperatura foi mantida entre 7°C e

10°C, verificada por meio de um termômetro (Incoterm®). Os animais foram gentilmente contidos sobre a tampa do recipiente e apenas o membro pélvico direito foi submerso na água, conforme ilustrado na Figura 1.

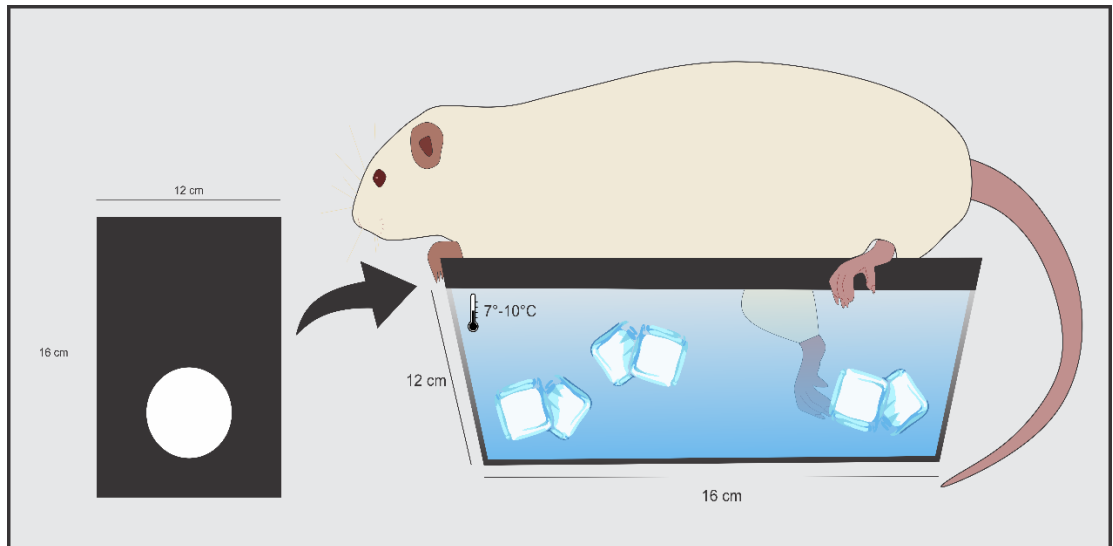


Figura 1 - Imagem ilustrativa do animal em sessão de crioterapia. À esquerda da imagem, esquema da vista de cima da tampa do recipiente, com a abertura para inserção de membro pélvico; à direita, demonstração de como foram acomodados os animais para as sessões. Fonte: a autora.

O procedimento consistiu na realização da crioterapia nos animais do grupo CRIO e GOTACRIO. O protocolo iniciou-se 7 horas após a aplicação intra-articular, no pico agudo da nocicepção (TAVARES *et al.*, 2021; DESAI; STEIGER; ANDERS, 2017) e foi conduzido por um período de 10 minutos de imersão em uma única sessão por animal. Os animais repetiram as avaliações funcionais após o tratamento, sendo uma avaliação imediatamente após o tratamento (AV2) e uma tardia, após 1 hora do tratamento (AV3) para análise de seus efeitos sobre a gota e o desempenho dos animais. Os animais do grupo CONT e GOTA sofreram a simulação do tratamento, com a submersão do membro pélvico direito em água em temperatura ambiente.

A temperatura (termômetro infravermelho HC260 Multilaser®) superficial foi verificada previamente à aplicação da terapia e após 10 minutos, sendo que os valores observados foram $36,12 \pm 0,64^{\circ} \text{C}$ e $21,37 \pm 0,46^{\circ} \text{C}$, respectivamente (Figura 2).

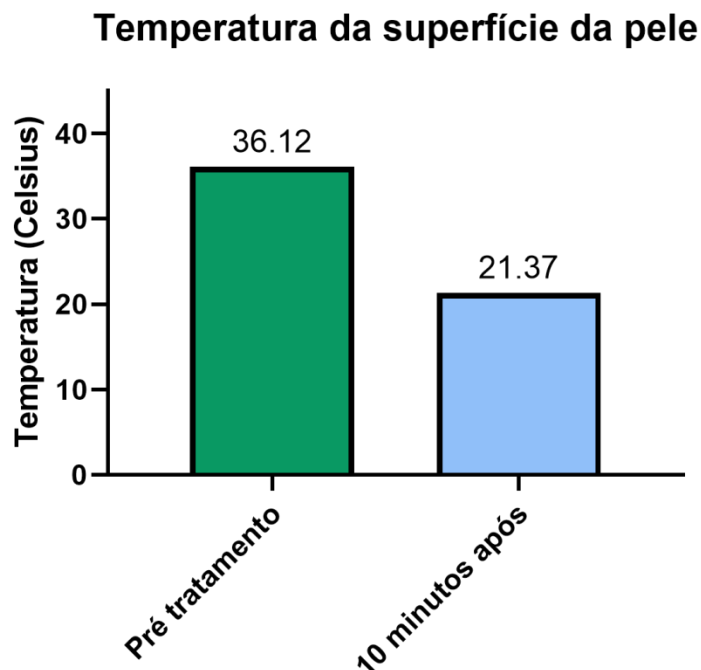


Figura 2 - Resultado da avaliação da temperatura da superfície da pele. Demonstração da temperatura da pele da articulação do joelho direito antes e 10 minutos após o tratamento de crioterapia por imersão. Resultados expressos como média \pm erro padrão.

Avaliação da migração leucocitária

Após a AV3, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico, sendo anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (Ketalar – Brasil) (95 mg/Kg) e xilazina (Xilazin – Brasil) (45 mg/Kg). Após verificação do estado de consciência do animal (observado pela ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e pregas interdigitais), foi coletado 5 μ l do fluido sinovial da articulação de membro pélvico direito para o preparo de uma lâmina de esfregaço. Por meio desta lâmina, realizou-se a contagem diferencial dos leucócitos (mononucleares e polimorfonucleares) em microscópio de luz e objetiva 100x em imersão. As lâminas foram coradas com maygrunwald e giemsa. Para a contagem das células, utilizou-se o aplicativo *WBC Counter 1.1.0*® (Japão).

Para a contagem total da migração leucocitária, foi realizada a lavagem articular com 100 μ L de solução fisiológica 0,9% com 4 μ L de E.D.T.A 5% com auxílio de uma pipeta digital. Dessa coleta, diluiu-se 20 μ l do lavado articular em líquido de Turk (ácido acético glacial 2 ml, azul de metileno 1% e água destilada 98 ml), e a

contagem dos leucócitos totais foi realizada em uma câmara vítrea, Neubauer (células/mm³). Uma gota dessa diluição foi depositada sobre a câmara com auxílio de uma pipeta digital, e com microscópio de luz comum, na objetiva de 40x a contagem das células foi determinada para quatro quadrantes. Ao final, foi realizada a correção pelo fator de diluição utilizado para o grupo específico, o resultado foi expresso em células por mm³.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS 20.0® por meio de Modelos Lineares, sendo que para as avaliações funcionais foram utilizados Modelos Lineares Mistos e nas comparações entre os grupos para a contagem celular foram utilizados Modelos Lineares Generalizados, em ambos foi utilizado como pós-teste o LSD, o nível de significância aceito foi de 5%. Os gráficos foram confeccionados por meio do programa Graph Pad Prism 5®.

RESULTADOS

Avaliação de nocicepção

Para análise do limiar nociceptivo, observou-se diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,001$) e entre as avaliações ($p < 0,001$). Entre os grupos, o GOTA e GOTACRIO apresentaram redução do limiar de retirada da pata quando comparados aos grupos CONT e CRIO ($p < 0,001$). O grupo GOTACRIO foi diferente do grupo GOTA ($p < 0,001$), revertendo a redução do limiar de retirada da pata.

Já a análise realizada entre as avaliações ao longo do tempo, tanto para o grupo GOTA quanto o GOTACRIO, AV1 apresentou um redução significativa do limiar nociceptivo quando comparado ao AV0 ($p > 0,001$), redução que se manteve para o grupo GOTA nas avaliações AV2 e AV3 ($p = 0,723$; $p = 0,219$). Já no grupo GOTACRIO,

houve aumento significativo do limiar nociceptivo para AV2 quando comparado ao AV1 ($p < 0,001$). O limiar foi reduzido novamente na AV3, porém, ainda diferente de AV1 ($p < 0,001$) (Figura 3).

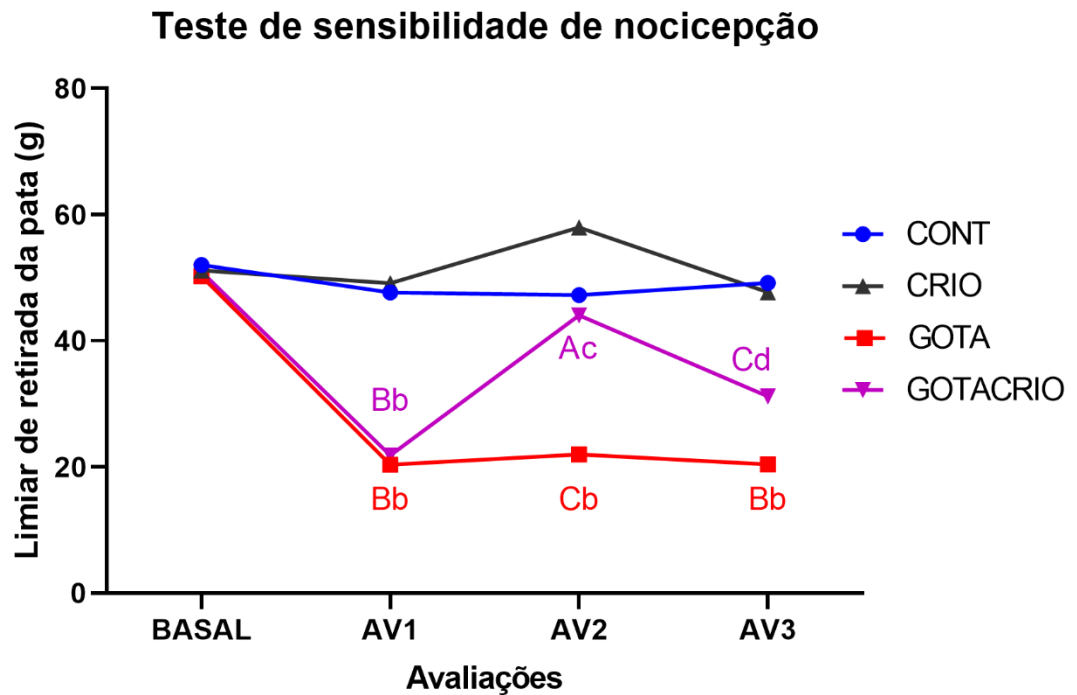


Figura 3 – Resultado da avaliação funcional para teste de sensibilidade. Demonstração de comportamento do limiar de nocicepção entre grupos e entre avaliações. CONT-grupo controle, CRIO-grupo controle crioterapia, GOTA-grupo gota, GOTACRIO-grupo gota crioterapia. Resultados expressos em média±erro padrão. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. Letras minúsculas, comparação dentro do mesmo grupo; letras maiúsculas, comparação entre os grupos ao longo das avaliações, letras iguais apresentam semelhança estatística.

Mensuração do edema articular

Na avaliação do edema articular, observou-se aumento significativo do diâmetro dos grupos GOTA e GOTACRIO quando comparados aos grupos controles CONT e CRIO ($p < 0,01$). Porém, na comparação entre os grupos GOTA e GOTACRIO, observou-se que estes foram semelhantes ($p > 0,07$).

Nos resultados entre as avaliações, nos grupos GOTA e GOTACRIO houve diferença apenas da avaliação basal para as demais ($p < 0,001$), enquanto AV1, AV2

e AV3 foram semelhantes ($p>0,05$), apontando manutenção do edema articular. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre as avaliações ($p>0,05$) (Figura 4).

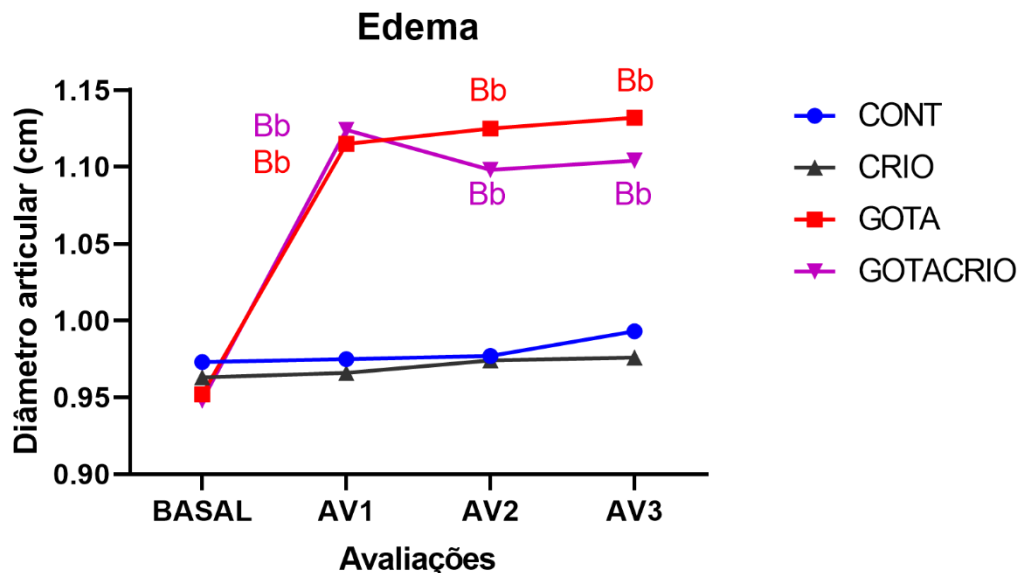


Figura 4 – Resultado da avaliação funcional para avaliação do edema por diâmetro articular. Gráfico demonstrando o comportamento do edema inflamatório entre grupos e entre avaliações. CONT-grupo controle, CRIO-grupo controle crioterapia, GOTA-grupo gota, GOTACRIO-grupo gota crioterapia. Resultados expressos em média±erro padrão, este indicado pelas barras acima das linhas. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. Letras minúsculas, comparação dentro do mesmo grupo; letras maiúsculas, comparação entre os grupos ao longo das avaliações, letras iguais apresentam semelhança estatística.

Força de preensão

Para análise da avaliação de força muscular dos animais, entre os grupos, o resultado demonstrou que, todos os grupos experimentais foram semelhantes, não havendo diferença entre eles ($p>0,05$).

No resultado entre as avaliações, o grupo GOTACRIO apresentou diferença significativa de AV1 para as avaliações basais, demonstrando uma redução da força de preensão nesta avaliação ($p=0,03$), revertido após a aplicação do tratamento com crioterapia, evidenciado pelo retorno aos valores basais durante as AV2 e AV3 ($p>0,05$). O grupo GOTA apresentou diferença quanto à basal em relação às

avaliações 2 e 3 ($p < 0,05$), indicando a perda de força muscular ao longo do experimento (Figura 5).

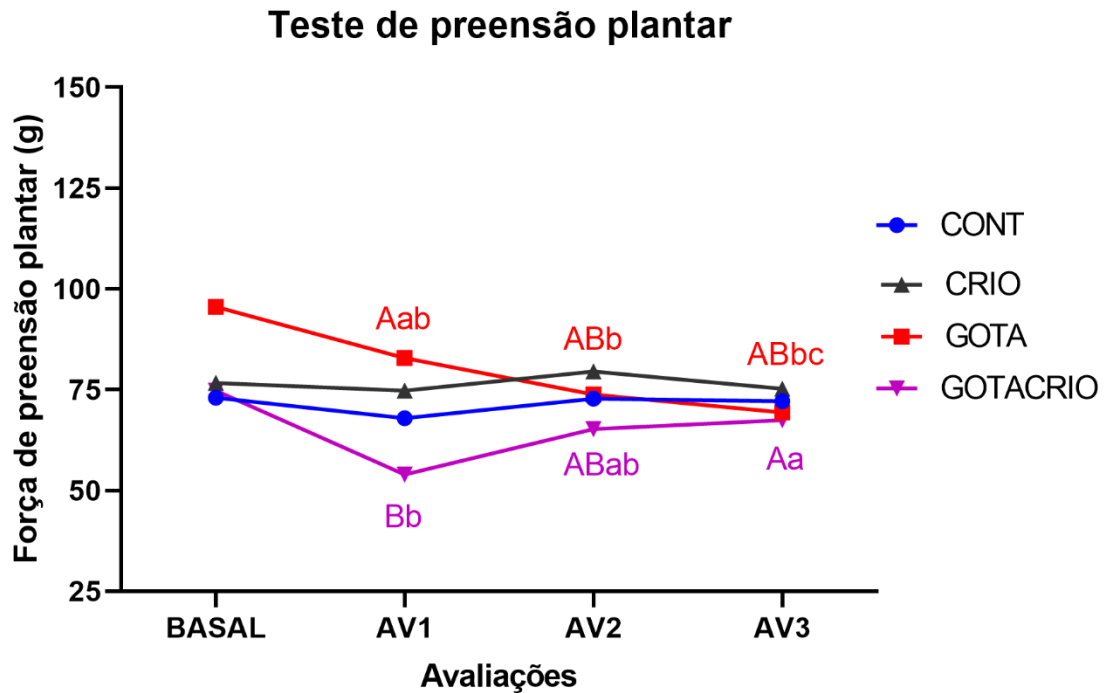


Figura 5 – Resultado da avaliação funcional para avaliação de força muscular. Gráfico demonstrando comportamento da força de prensão plantar entre grupos e entre avaliações. CONT-grupo controle, CRIO-grupo controle crioterapia, GOTA-grupo gota, GOTACRIO-grupo gota crioterapia. Resultados expressos em média±erro padrão. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. Letras minúsculas, comparação dentro do mesmo grupo; letras maiúsculas, comparação entre os grupos ao longo das avaliações, letras iguais apresentam semelhança estatística.

Avaliação de migração leucocitária

Ao avaliar a migração leucocitária, houve aumento significativo na concentração de leucócitos nos grupos GOTA e GOTACRIO ($p < 0,001$) (Figura 6). O tratamento com crioterapia, grupo GOTACRIO, não apresentou diferença ao GOTA ($p > 0,05$).

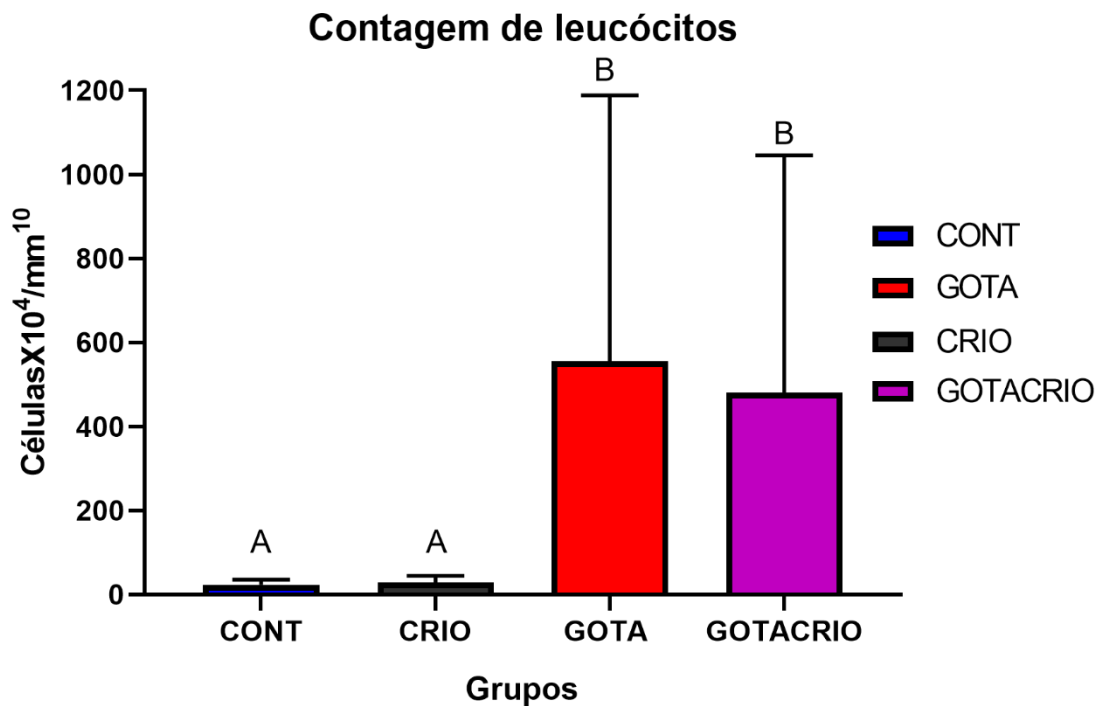


Figura 6 – Resultado da contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. Gráfico demonstrativo da contagem de leucócitos. CONT-grupo controle, CRIO-grupo controle crioterapia, GOTA-grupo gota, GOTACRIO-grupo gota crioterapia. Resultados expressos em média \pm erro padrão. As barras sobre as linhas indicam desvio padrão. Letras (A; B) representam diferenças significativas entre os grupo; letras diferentes representam a ocorrência de diferenças significativas, enquanto letras iguais sobre as barras indicam resultados iguais estatisticamente.

Para a diferenciação celular entre os polimorfonucleares, os grupos controles foram semelhantes entre si ($p > 0,05$), assim como os grupos experimentais entre eles ($p > 0,05$). Houve diferença significativa entre GOTACRIO e os controles CONT e CRIO ($p = 0,008$; $p = 0,01$); também houve diferença estatística entre GOTA e os controles CONT e CRIO ($p = 0,014$; $p = 0,018$).

Quanto às células mononucleares, não houve diferença entre GOTACRIO e grupo GOTA ($p > 0,05$); tanto o grupo GOTA quanto o grupo GOTACRIO foram diferentes dos grupos controles CONT e CRIO ($p < 0,05$) (Figura 7).

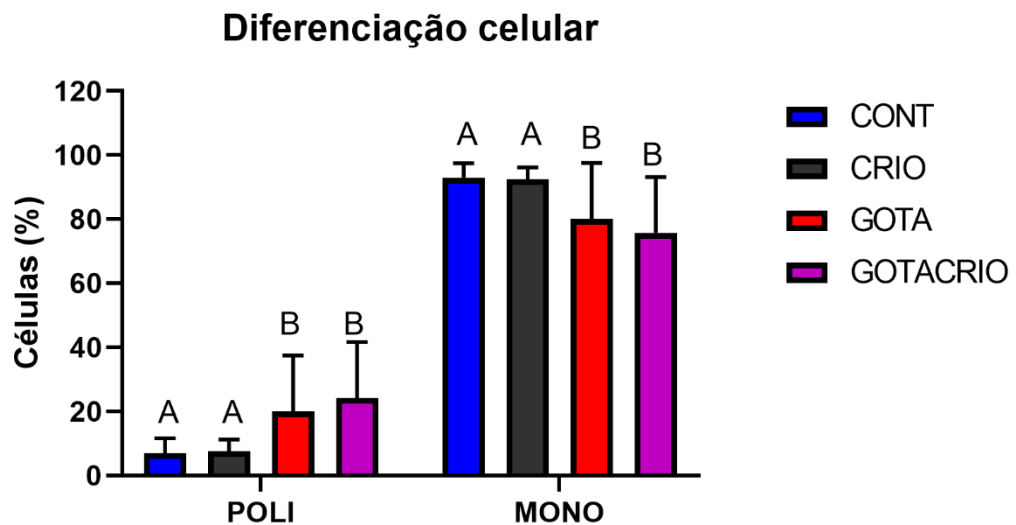


Figura 7 – Resultado da contagem das células com diferenciação. Gráfico demonstrativo da diferenciação celular entre polimorfonucleares-POLI e mononucleares-MONO. CONT-grupo controle, CRIO-grupo controle crioterapia, GOTA-grupo gota, GOTACRIO-grupo gota crioterapia. Resultados expressos em média \pm erro padrão. As barras sobre as linhas indicam desvio padrão. Letras (A; B) representam diferenças significativas entre os grupo; letras diferentes representam a ocorrência de diferenças significativas, enquanto letras iguais sobre as barras indicam resultados iguais estatisticamente.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a nocicepção, força de preensão plantar, edema e perfil inflamatório celular de lavado sinovial de ratos submetidos ao modelo experimental de gota e tratados com crioterapia, observando-se efeitos positivos em algumas análises funcionais, porém não no perfil celular inflamatório.

A indução da gota reduziu o limiar nociceptivo dos animais, efeito esse que foi revertido pelo tratamento com a crioterapia. O efeito deste modelo experimental sobre o limiar nociceptivo já foi demonstrado em algumas pesquisas que apresentaram a redução do limiar nociceptivo (ZANG *et al.*, 2020; MARCOTTI *et al.*, 2018). Estudos apontam que apenas a presença dos cristais pode desencadear dor, pela sensibilização de fibras C, devido ativação de receptores de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1), um canal de cátions não seletivo (RAMONDA *et al.*, 2014). Já o efeito da crioterapia sobre o limiar nociceptivo pode ser explicado pelos efeitos

medulares da crioterapia, uma vez que ela atua no aumento do limiar de nocicepção (NADLER; WEINGAND; KRUSE, 2014) e redução da velocidade de condução dos sinais nervosos (ALGAFLY; GEORGE, 2007). Os trabalhos de Herrera *et al.* (2011) e Herrera *et al.* (2010) corroboram essa hipótese, segundo os autores, a velocidade de condução nervosa em indivíduos submetidos à crioterapia de imersão é reduzida quando comparado aos grupos controles.

O edema articular presente na gota está relacionado ao processo inflamatório característico da doença (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; DESAI; STEIGER; ANDERS, 2017). Como o esperado, os animais deste estudo, após indução da gota, desenvolveram edema articular em membro pélvico direito, apresentando diferença na circunferência da articulação em relação às suas medidas basais. Após o tratamento com crioterapia, porém, não houve redução do edema, demonstrando que, no presente estudo, a crioterapia não foi eficaz em reduzi-lo. Apesar da crioterapia ser utilizada no tratamento do edema na osteoartrite e artrite reumatóide (DEMOULIN; VANDERTHOMMEN, 2012), estudos que a relacionam à gota ainda são escassos. A redução do edema pela crioterapia estaria ligada à supressão do processo inflamatório devido à vasoconstrição e efeito antiacetilcolinesterásico ocasionados pelo resfriamento dos tecidos adjacentes à sua aplicação (MARTINS *et al.*, 2016; FURTADO *et al.*, 2018). Entretanto, os resultados do presente estudo endossam os achados de Moreira *et al.* (2011), que avaliaram os efeitos da crioterapia em um modelo de sinovite experimental em ratos Wistar, e do ensaio clínico de Schelsinger (2002), que avaliou a aplicação de gelo tópico em pacientes com gota. Em ambos não houve diferença estatística entre os grupos tratados e controle para esta variável.

Pesquisas reportam que a perda de força muscular em pacientes com gota está relacionada à formação de tofos nas articulações e o comprometimento da sua movimentação (YU; LIEN; HO, 2004), e a dor local (STWART *et al.*, 2016; STWART; DALBETH; VANDAL; ROME, 2016). No presente estudo, a crioterapia propiciou o aumento do limiar de nocicepção, a recuperação e a manutenção da força muscular dos animais, com retorno da força ao valores prévios à indução da gota, corroborando com Tavares *et al.* (2021) que utilizaram um protocolo de crioterapia de 20 minutos em duas sessões em um modelo de gota experimental em ratos Wistar. O retorno e manutenção da força muscular podem estar relacionados ao aumento do limiar de nocicepção, que permitiu um maior torque muscular, já que limiares de nocicepção

reduzidos levam ao comprometimento da ativação muscular isométrica, concêntrica e excêntrica (RICE *et al.*, 2019). Segundo Stewart *et al.* (2017), a perda da força motora está ligada à perda da funcionalidade do membro afetado pela gota, impactando na capacidade de realização de atividades diárias, portanto a crioterapia poderia ser adjuvante no retorno da funcionalidade e realização de atividades diárias para portadores da doença.

No processo inflamatório da gota os, microcristais de urato estimulam monócitos e macrófagos a produzirem IL-1 β liberada por intermédio do complexo proteico intracelular NALP3, ocorrendo em seguida o influxo de neutrófilos, processo que ocorre com grande semelhança entre humanos e ratos (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016). Ocorre ainda a ativação de células de defesa menos diferenciadas com a síntese de fator de necrose tumoral TNF- α em conjunto com a fagocitose dos macrófagos, que leva à indução de outras interleucinas como a IL-6 e IL-8, potencializando a cascata inflamatória (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005), enquanto a crioterapia possui efeito antiacetilcolinesterásico, pela sensibilidade térmica da enzima AChE, retardando a degradação da ACh, inibidora da IL-1 β e TNF- α , dificultando assim o progresso do processo inflamatório das articulações envolvidas e promovendo a melhora do quadro clínico e alívio da sintomatologia da gota (FURTADO *et al.*, 2018), indica-se que futuras pesquisas possam avaliar a concentração de tais interleucinas, o que é uma das limitações deste estudo.

Segundo dados da literatura, a crioterapia pode ser eficaz em reduzir a migração leucocitária (GUILLOT *et al.*, 2014). Porém, no presente trabalho a crioterapia não foi eficaz na redução da concentração de leucócitos em líquido sinovial do grupo tratado. Uma possível justificativa para esse achado pode ser a realização de uma única sessão de crioterapia, pois um estudo que analisou o perfil inflamatório sinovial de ratos Wistar com osteoartrite induzida experimentalmente em que foram realizadas duas sessões de crioterapia, houve redução da concentração de leucócitos em relação ao grupo controle (BARBOSA *et al.*, 2019). Quanto à diferenciação celular em células mononucleares e polimorfonucleares, o protocolo de crioterapia não foi capaz de alterar o perfil inflamatório, com aumento da concentração de polimorfonucleares e redução da concentração de mononucleares, sendo os neutrófilos uma das principais células da resposta inflamatória da gota (DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016).

Embora a gota seja uma doença tratável, seu manejo não é otimizado para parte dos pacientes, pois o tratamento medicamentoso muitas vezes não é suficiente para o controle dos sintomas (RICHETTE *et al.*, 2017). A crioterapia, conforme demonstrado nesta pesquisa, pode ser uma alternativa como adjuvante no manejo dos sintomas relacionados à dor e funcionalidade, promovendo a otimização do tratamento e a melhora da qualidade de vida dos pacientes.

CONCLUSÃO

O modelo experimental de gota mostrou-se efetivo em mimetizar alterações funcionais como o edema inflamatório, redução do limiar nociceptivo, diminuição de força muscular e aumentar a presença de células inflamatórias no líquido sinovial. O tratamento com crioterapia foi eficaz para aumentar o limiar de nocicepção e promoção do retorno e manutenção da força muscular, entretanto não reverteu o edema e também não alterou o padrão de migração celular no líquido sinovial.

REFERÊNCIAS

- Algafly, A.A., George, K.P., 2007. The effect of cryotherapy on nerve conduction velocity, pain threshold and pain tolerance. *Br. J. Sports Med.* 41, 365–369. <https://doi.org/10.1136/bjism.2006.031237>
- Barbosa, G.M., Cunha, J.E., Cunha, T.M., Martinho, L.B., Castro, P.A.T.S., Oliveira, F.F.B., Cunha, F.Q., Ramalho, F.S., Salvini, T.F., 2019. Clinical-like cryotherapy improves footprint patterns and reduces synovial inflammation in a rat model of post-traumatic knee osteoarthritis. *Sci. Rep.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50958-8>
- Bertelli, J.A., Mira, J.C., 1995. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J. Neurosci. Methods* 58, 151–155. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)00169-H](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)00169-H)

- Choi, H.K., Mount, D.B., Reginato, A.M., 2005. Pathogenesis of Gout. *Ann. Intern. Med.* 143, 499–516.
- Coderre, T.J., Wall, P.D., 1987. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. *Pain* 28, 379–393. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90072-8)
- Dalbeth, N., Merriman, T.R., Stamp, L.K., 2016. Gout. *Lancet* 388, 2039–2052. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00346-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00346-9)
- Demoulin, C., Vanderthommen, M., 2012. Cryotherapy in rheumatic diseases. *Jt. Bone Spine* 79, 117–118. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.09.016>
- Desai, J., Steiger, S., Anders, H.-J., 2017. Molecular Pathophysiology of Gout. *Trends Mol. Med.* 23, 756–768. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.06.005>
- Dutta, R., Lunzer, M.M., Auger, J.L., Akgün, E., Portoghese, P.S., Binstadt, B.A., 2018. A bivalent compound targeting CCR5 and the mu opioid receptor treats inflammatory arthritis pain in mice without inducing pharmacologic tolerance. *Arthritis Res. Ther.* 20, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1661-5>
- Finch, A., Kubler, P., 2016. The management of gout. *Aust. Prescr.* 39, 119–122. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2016.047>
- Furtado, A.B.V., Hartmann, D.D., Martins, R.P., Rosa, P.C., da Silva, I.K., Duarte, B.S.L., Signori, L.U., Soares, F.A.A., Puntel, G.O., 2018. Cryotherapy: Biochemical alterations involved in reduction of damage induced by exhaustive exercise. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 51, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187702>
- Guillot, X., Tordi, N., Mourot, L., Demougeot, C., Dugué, B., Prati, C., Wendling, D., 2014. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: A systematic review. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10, 281–294. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.870036>
- Herrera, E., Sandoval, M.C., Camargo, D.M., Salvini, T.F., 2010. Motor and sensory nerve conduction are affected differently by ice pack, ice massage, and cold water immersion. *Phys. Ther.* 90, 581–591. <https://doi.org/10.2522/ptj.20090131>
- Herrera, E., Sandoval, M.C., Camargo, D.M., Salvini, T.F., 2011. Effect of walking and resting after three cryotherapy modalities on the recovery of sensory and motor nerve conduction velocity in healthy subjects. *Brazilian J. Phys. Ther.* 15, 233–240. <https://doi.org/10.1590/s1413-35552011000300010>
- Karvat, J., Kakihata, C.M.M., Vieira, L., Silva, J.L. da C., Ribeiro, L. de F.C., Brancalhão, R.M.C., Bertolini, G.R.F., 2018. Análise do tecido muscular de ratos Wistar submetidos ao modelo de compressão do nervo isquiático e à crioterapia. *Einstein* 16, 1–7. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082018AO4206>
- Khanna, D., Fitzgerald, J.D., Khanna, P.P., Bae, S., Singh, M.K., Neogi, T., Pillinger, M.H., Merrill, J., Lee, S., Prakash, S., Kaldas, M., Gogia, M., Perez-Ruiz, F., Taylor, W., Lioté, F., Choi, H., Singh, J.A., Dalbeth, N., Kaplan, S., Niyyar, V., Jones, D., Yarows, S.A.,

- Roessler, B., Kerr, G., King, C., Levy, G., Furst, D.E., Edwards, N.L., Mandell, B., Schumacher, H.R., Robbins, M., Wenger, N., Terkeltaub, R., 2012. 2012 American college of rheumatology guidelines for management of gout. part 1: Systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res.* 64, 1431–1446. <https://doi.org/10.1002/acr.21772>
- Marcotti, A., Miralles, A., Dominguez, E., Pascual, E., Gomis, A., Belmonte, C., De La Peña, E., 2018. Joint nociceptor nerve activity and pain in an animal model of acute gout and its modulation by intra-articular hyaluronan. *Pain* 159, 739–748. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001137>
- Martins, C.N., Moraes, M.B., Hauck, M., Guerreiro, L.F., Rossato, D.D., Varela, A.S., da Rosa, C.E., Signori, L.U., 2016. Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats. *Physiother. (United Kingdom)* 102, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.physio.2015.10.013>
- Moreira, N.B., Artifon, E.L., Meireles, A., Silva, L.I., Rosa, C.T., Ricardo, G., Bertolini, F., 2011. A influência da crioterapia na dor e edema induzidos por sinovite experimental The cryotherapy influence on pain and edema induced by experimental synovitis. *Fisioterapia e Pesqui.* 18, 79–83.
- Nadler, S.F., Weingand, K., Kruse, R.J., 2004. The Physiologic Basis and Clinical Applications of Cryotherapy and Thermotherapy for the Pain Practitioner. *Pain Physician* 7, 395–399.
- Perez-Ruiz, F., Castillo, E., 2014. Physiopathology of gout, in: *Managing Gout in Primary Care*. Springer Healthcare, pp. 13–24. https://doi.org/10.1007/978-1-907673-67-2_2
- Qaseem, A., Harris, R.P., Forciea, M.A., Denberg, T.D., Barry, M.J., Boyd, C., Chow, R.D., Fitterman, N., Humphrey, L.L., Kansagara, D., Manaker, S., McLean, R.M., Vijan, S., Wilt, T.J., 2017. Management of acute and recurrent gout: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann. Intern. Med.* 166, 58–68. <https://doi.org/10.7326/M16-0570>
- R. Ramonda, P. Frallonardo, F. Oliviero, M.G. Lorenzin, A. Ortolan, A. Scanu, L.P., 2014. Pain and microcrystalline arthritis. *Reumatismo* 1, 48–56.
- Rice, D.A., Mannion, J., Lewis, G.N., McNair, P.J., Fort, L., 2019. Experimental knee pain impairs joint torque and rate of force development in isometric and isokinetic muscle activation. *Eur. J. Appl. Physiol.* 119, 2065–2073. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04195-6>
- Richette, P., Doherty, M., Pascual, E., Barskova, V., Becce, F., Castañeda-Sanabria, J., Coyfish, M., Guillo, S., Jansen, T.L., Janssens, H., Lioté, F., Mallen, C., Nuki, G., Perez-Ruiz, F., Pimentao, J., Punzi, L., Pywell, T., So, A., Tausche, A.K., Uhlig, T., Zavada, J., Zhang, W., Tubach, F., Bardin, T., 2017. 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Ann. Rheum. Dis.* <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209707>

- Roddy, E., Mallen, C.D., Doherty, M., 2013. Gout. *Br. Med. J.* 347, 179–195. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59963-2_8
- Santos, F., 2016. Gota: uma revisão. *Rev. Médica da UFPR* 3, 25–31. <https://doi.org/10.5380/rmu.v3i1.46382>
- Schlesinger, N., Detry, M.A., Holland, B.K., Baker, D.G., Beutler, A.M., Rull, M., Hoffman, B.I., Schumacher, H.R., 2002. Local ice therapy during bouts of acute gouty arthritis. *J. Rheumatol.* 29, 331–334.
- Stewart, S., Dalbeth, N., Otter, S., Gow, P., Kumar, S., Rome, K., 2017. Clinically-evident tophi are associated with reduced muscle force in the foot and ankle in people with gout: A cross-sectional study. *J. Foot Ankle Res.* 10, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13047-017-0207-4>
- Stewart, S., Dalbeth, N., Vandal, A.C., Rome, K., 2016. Spatiotemporal gait parameters and plantar pressure distribution during barefoot walking in people with gout and asymptomatic hyperuricemia: Comparison with healthy individuals with normal serum urate concentrations. *J. Foot Ankle Res.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13047-016-0147-4>
- Stewart, S., Morpeth, T., Dalbeth, N., Vandal, A.C., Carroll, M., Davidtz, L., Mawston, G., Otter, S., Rome, K., 2016. Foot-related pain and disability and spatiotemporal parameters of gait during self-selected and fast walking speeds in people with gout: A two-arm cross sectional study. *Gait Posture* 44, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2015.11.004>
- Yu, K.H., Lien, L.C., Ho, H.H., 2004. Limited knee joint range of motion due to invisible gouty tophi. *Rheumatology* 43, 191–194. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg478>
- Zhang, F., Liu, S., Jin, L., Tang, L., Zhao, X., Yang, T., Wang, Y., Huo, B., Liu, R., Li, H., 2020. Antinociceptive Efficacy of Retigabine and Flupirtine for Gout Arthritis Pain. *Pharmacology* 105, 471–476. <https://doi.org/10.1159/000505934>

ANEXO I



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

Autorização

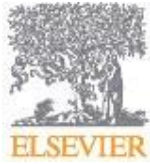
O Protocolo nº 20-19 intitulado "Efeitos da mobilização articular e crioterapia no modelo experimental de gota. Análises funcionais e morfológicas", sob a responsabilidade de Gladson Ricardo Flor Bertolini que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 16/08/2019. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2019 - 28/02/2021
Espécie/Inhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
N. de animais	80
Peso/idade	250 – 350 g - 12 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Setorial

Cascavel, 16/08/2019.

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
 Coordenadora do CEUA
 Portaria nº 3128/2018-GRE

ANEXO II



JOURNAL OF THERMAL BIOLOGY

Environment, Evolution and Medicine

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS



●	Description	
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.2
		p.2
		p.4

ISSN: 0306-4565

DESCRIPTION

The *Journal of Thermal Biology* publishes articles that advance our knowledge on the ways and **mechanisms** through which **temperature** affects man and animals. This includes studies of their **responses** to these effects and on the **ecological** consequences. Directly relevant to this theme are:

- The mechanisms of **thermal limitation**, heat and cold injury, and the resistance of organisms to extremes of temperature
- The mechanisms involved in **acclimation**, acclimatization and evolutionary adaptation to temperature
- Mechanisms underlying the patterns of **hibernation**, torpor, dormancy, aestivation and diapause
- Effects of temperature on reproduction and development, growth, ageing and life-span
- Studies on modelling **heat transfer** between organisms and their environment
- The contributions of temperature to effects of **climate change** on animal species and man
- Studies of **conservation biology** and physiology related to temperature
- Behavioural and physiological **regulation of body temperature** including its pathophysiology and fever
- Medical applications of hypo- and hyperthermia

types:

- Original articles
- Review articles

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discountson Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Biologists, biochemists, physiologists and zoologists.

IMPACT FACTOR

2019: 2.361 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

EMBiology

BIOSIS Citation Index

Elsevier BIOBASE

Cambridge Scientific Abstracts

Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental SciencesEmbase

INSPEC

Current Contents

Pascal Francis

Research Alert

Current Contents

Current Contents

Current Contents - Life Sciences

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors

C.J. Gordon, , North Carolina, United States

H.-O. Pörtner, Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Am Handelshafen 12; Postfach 120161, 27570, Bremerhaven, Germany

Founding Editors

K. Bowler[†], Durham, United Kingdom

J.E. Heath

Editorial Board Members

M.J. Angilletta Jr., Arizona State University, Tempe, Arizona, United States

D. Atkinson, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

G.S. Bakken, Indiana University Bloomington Department of Biology, Bloomington, Indiana, United States

L.G.S. Branco, University of Sao Paulo Faculty of Dentistry of Ribeirao Preto, RIBEIRAO PRETO, Brazil

M.J. Buono, San Diego State University, San Diego, California, United States

M. Cabanac, Laval University, Quebec, Quebec, Canada

M. Caputa, Nicolaus Copernicus University in Torun, Torun, Poland

S. Clusella-Trullas, Stellenbosch University DST-NRF Centre of Excellence for Invasion Biology, Matieland, South Africa

A.R. Cossins, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

J.R. David, Evolution Genomes Behaviour and Ecology, Gif sur Yvette, France

Q. Deng, Central South University School of Energy Science and Engineering, Changsha, China

R.B. Huey, University of Washington, Seattle, Washington, United States

I.A. Johnston, University of St Andrews Scottish Oceans Institute, St. Andrews, United Kingdom

M.R. Kearney, The University of Melbourne, Victoria, Victoria, Australia

L.R. Leon, US Army Research Institute of Environmental Medicine, Natick, Massachusetts, United States

F. Marino, Charles Sturt University School of Exercise Science Sport and Health, Bathurst, Australia

D. J. McCafferty, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom

J. Overgaard, Aarhus University, Aarhus, Denmark

R. Refinetti, University of New Orleans, New Orleans, Louisiana, United States

J. Roth, University of Giessen, Gießen, Germany

M. Sawka, US Army Research Institute of Environmental Medicine, Natick, Massachusetts, United States

F. Seebacher, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia

H.A. Shiels, The University of Manchester, Manchester, United Kingdom

D. Shrivastava, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, United States

J. Sinclair, Western University Department of Biology, London, Ontario, Canada

D.E. Spiers, University of Missouri, Columbia, Missouri, United States

G.J. Tattersall, Brock University, St Catharines, Ontario, Canada

N.A.S. Taylor, University of Wollongong, Wollongong, New South Wales, Australia

J.S. Terblanche, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa

D.-H. Wang, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

F. Wang, The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, Hong Kong

G. Williams, University of Hong Kong, Hong Kong SAR, PR China China

T.E. Wilson, University of Kentucky Department of Physiology, Lexington, Kentucky, United States

GUIDE FOR AUTHORS

Types of paper

The journal publishes general articles and review articles.

Contact details for submission

Papers should be submitted via Editorial Manager at <https://www.editorialmanager.com/tb/default.aspx>.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Informed Consent:

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper.

Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. Particular care should be taken with obtaining consent where children are concerned (in particular where a child has special needs or learning disabilities), where an individual's head or face appears, or where reference is made to an individual's name or other personal details.

Human and animal rights:

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org> Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These

guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note

that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the [latest Elsevier article class](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [Guidelines](#) has full details.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may begin with a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Vitae

Submit a short (maximum 100 words) biography of each author, along with a passport-type photograph accompanying the other figures. Please provide the biography in an editable format (e.g. Word), not in PDF format.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with

abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus,

CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-thermal-biology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at

proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*.19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body

text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *MendeleyData*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www>