

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DA CINESIOTERAPIA ASSOCIADA AO
BIOPRODUTO À BASE DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia
zerumbet* SOBRE O COLÁGENO DOS TECIDOS
MUSCULARES ESPÁSTICOS DE RATOS PÓS-LESÃO
MEDULAR**

FELIPE LIMA DE CERQUEIRA

ARACAJU
Janeiro – 2015

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DA CINESIOTERAPIA ASSOCIADA AO
BIOPRODUTO À BASE DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia
zerumbet* SOBRE O COLÁGENO DOS TECIDOS
MUSCULARES ESPÁSTICOS DE RATOS PÓS-LESÃO
MEDULAR**

Dissertação de mestrado submetido à
banca examinadora para obtenção do
título de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Saúde e Ambiente da
Universidade Tiradentes – UNIT, Aracaju
- Sergipe.

Linha de concentração: Produtos
Naturais e Saúde.

FELIPE LIMA DE CERQUEIRA

Orientadora: Prof.^a Edna Aragão Farias Cândido, D.Sc.

ARACAJU
Janeiro – 2015

-
- C411e Cerqueira, Felipe Lima de
Efeitos da cinesioterapia associada ao bioproduto à base do óleo essencial da alpinia zerumbet sobre o colágeno dos tecidos musculares espásticos de ratos pós-lesão / Felipe Lima de Cerqueira; orientação [de] Profª. Drª Edna Aragão Farias Cândido – Aracaju: UNIT, 2015.
140 p.; il.
- Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2015.
Inclui bibliografia.
1. Alpinia. 2. Fisioterapia. 3. Espasticidade muscular. 4. Lesão medular. 5. Colágeno. I. Cândido, Edna Aragão Farias. (orient.). II. Universidade Tiradentes. III. Título.

CDU: 504:543

Ficha catalográfica: Rosângela Soares de Jesus CRB/5 1701

**EFEITOS DA CINESIOTERAPIA ASSOCIADA AO
BIOPRODUTO À BASE DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia
zerumbet* SOBRE O COLÁGENO DOS TECIDOS
MUSCULARES ESPÁSTICOS DE RATOS PÓS-LESÃO
MEDULAR**

FELIPE LIMA DE CERQUEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE

Aprovado em ____/____/____ por:

D.Sc. Edna Aragão Farias Cândido
Orientadora

D.Sc. Sheyla Aleves Rodrigues
Instituto Federal de Sergipe

D.Sc. Juliana Cordeiro Cardoso
Universidade Tiradentes/SE

D.Sc. Paulo Autran Leite Lima
Universidade Tiradentes/SE
(Suplente)

D.Sc. Margarete Zanardo Gomes
Universidade Tiradentes/SE
(Suplente)

ARACAJU
Janeiro – 2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ivan e Almerinda,
pela dedicação e empenho à minha
formação educacional e moral.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela confiança e apoio incondicional;

Aos meus irmãos que, de perto ou de longe contribuíram em atitudes ou pensamento para a realização desta etapa;

À minha esposa Marlinda por suportar minha ausência em diversos momentos dessa caminhada;

À Dr^a Edna Aragão, professora da graduação, colega de trabalho e orientadora da pós graduação. Obrigado por toda paciência e dedicação para realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Saúde e Ambiente, que contribuíram para o meu aprimoramento profissional, em especial à professora Juliana Cardoso pelas contribuições valiosas para a realização deste trabalho e ao professor Ricardo Albuquerque pela ajuda em momentos fundamentais desta caminhada;

Aos amigos do Centro de Saúde da UNIT, do Hospital de Urgência de Sergipe e do Centro Especializado de Reabilitação, pela compreensão dos meus momentos de ausência nestes dois anos de caminhada;

Às pessoas que possibilitaram a realização deste mestrado, em especial Albertina Xavier, Prof. Carlos José e Prof. Hesmonney Santa Rosa;

Aos amigos pessoais que, mesmo distante, foram alicerce para esta caminhada;

Às alunas da iniciação científica, Giu, Lânia, Helen e Gabi, sem as quais seria impossível realizar este trabalho;

Minha querida turma do mestrado, que, em sua heterogeneidade, mostrou-se unida e forte desde o início. Em especial a Janaina, minha ex-aluna e atual colega de trabalho que me ensinou muito com sua experiência em pesquisa;

A coordenação e professores do curso de Fisioterapia da UNIT, em especial aos professores amigos Tarcísio Brandão, Aida Carla e Flávio Martins.

A todos os ex e atuais alunos. Razão pela qual dou hoje mais este passo em minha vida acadêmica profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	07
LISTA DE SIGLAS	09
RESUMO GERAL DA PROPOSTA	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1 Medula espinhal e lesão medular	13
3.2 Espasticidade	14
3.3 Tratamento	16
3.3.1 Tratamento Medicamentoso	16
3.3.2 Cinesioterapia	17
3.5 Alpinia zerumbet e o bioproduto.....	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 Desenho da pesquisa	19
4.2 Animais	19
4.3 Bioproduto	20
4.4 Grupos experimentais	20
4.5 Procedimento cirúrgico	21
4.6 Protocolo de tratamento	22
4.7 Protocolo de avaliação	22
4.8 Análise histomorfológica	24
4.9 Análise estatística	25
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	36
8. REFERÊNCIAS	36
ANEXO I – Comitê de ética em uso animal	
ANEXO II – Escore BBB	
APÊNDICE I – Artigo	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sequência do procedimento cirúrgico: posicionamento do animal; tricotomia e antissepsia da região; exposição da coluna vertebral; utilização do aparelho estereotáxico modificado para lesão medular.	22
Figura 2: Teste de capacidade motora sobre barra estreita	24
Figura 3: Teste de sensibilidade dolorosa.	24
Figura 4: Testes de posicionamento proprioceptivo e posicionamento tátil.	25
Figura 5: Componentes em destaque na análise cromatográfica do bioproduto à base do OEAz. Espectrometria de massa, coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), fluxo de gás hélio (1 mL/min), temperatura do detector e do injetor foi mantida a 250°C.	27
Figura 6. Comparativo do escore Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) intergrupos em músculos espásticos de ratos tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz em diferentes tempos pré tratamento.	27
Figura 7. Comparativo do escore Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) intergrupos em músculos espásticos de ratos tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz em diferentes tempos pós início do tratamento.	28
Figura 8. Comparativo do escore de Capacidade Motora (CM) intergrupos em músculos espásticos de ratos com alteração de colágeno, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz nos diferentes tempos pós início do tratamento.	29
Figura 9. Comparativo do escore de Sensibilidade Dolorosa, Posicionamento Proprioceptivo e Posicionamento Tátil intergrupos em músculos espásticos	30

de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproducto à base do OEAz nos tempos de 21 e 45 dias pós operatório.

Figura 10. Predominância de colágeno tipo I intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproducto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. **31**

Figura 11. Predominância de colágeno tipo III intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproducto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. **31**

Figura 12: Espessura de colágeno tipo I localizado no endomísio ou perimísio em intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproducto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. **32**

Figura 13: Espessura de colágeno tipo III localizado no endomísio ou perimísio em intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproducto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. **32**

Figura 14: Diagrama de dispersão entre espessura de colágeno tipo I do perimísio e escore BBB ($\rho=-0,97$) e espessura de colágeno tipo I do perimísio e escore CM ($\rho=-1,00$) em ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproducto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento ($p<0,05$). **33**

LISTA DE SIGLAS

Az	- <i>Alpinia zerumbet</i>
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
BBB	- Basso, Beattie e Bresnahan.
CEUA	- Comitê de Ética de Uso Animal.
CM	- Capacidade motora.
CTR	- Controle negativo
DL ₅₀	- Dose letal
DMNL	- Dose máxima não letal
DPO	- Dias pós operatório.
FT	- Fisioterapia
FTAz	- Fisioterapia associado ao óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
ITP	- Instituto de Tecnologia e Pesquisa.
LM	- Lesão medular.
MASCIS	- <i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study</i> .
MPC	- Movimentação passiva contínua
OEAz	- Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
OTG	- Órgão tendinoso de golgi
PP	- Posicionamento proprioceptivo.
PT	- Posicionamento tátil.
SD	- Sensibilidade dolorosa.
SHAN	- Controle positivo
SUS	- Sistema Único de Saúde.
UNIT	- Universidade Tiradentes.

EFEITOS DA CINESIOTERAPIA ASSOCIADA AO BIOPRODUTO À BASE DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* SOBRE O COLÁGENO DOS TECIDOS MUSCULARES ESPÁSTICOS DE RATOS PÓS-LESÃO MEDULAR.

RESUMO

A lesão medular (LM) é uma condição neurológica que envolve a interrupção parcial ou total do trânsito neuronal pela medula espinhal e pode resultar em deficiência física grave. A espasticidade é o transtorno mais incapacitante para o indivíduo pois limita a mobilidade e a funcionalidade do paciente. Trata-se de um conjunto de sintomas caracterizados pela exacerbação dos reflexos de estiramento, o que resulta em hiperreflexia e aumento do tônus muscular. As alterações no colágeno muscular estão presentes em músculos espásticos. O bioproduto derivado da *Alpinia zerumbet* tem ação antiespasmódica e reguladora da concentração de cálcio no músculo, bem como no alinhamento das fibras de colágeno. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da cinesioterapia associada ao bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre o colágeno dos tecidos musculares espásticos em modelo murino. Trata-se de uma pesquisa experimental realizada com 30 ratos (Wistar) divididos em cinco grupos de seis animais: grupo Az (tratado com bioproduto), FT (tratado com fisioterapia), FTAz (tratado com a associação bioproduto e fisioterapia), CTR (controle 1 - sem realização de tratamento) e SHAN (controle 2 - sem lesão medular). Procedeu-se laminectomia a nível da nona vertebra torácica seguida de lesão medular compressiva (exceto no grupo SHAN). Foram realizadas análises comportamentais identificando ausência de disfunções neurológicas do grupo SHAN, bem como total recuperação após 21 e 28 dias dos grupo Az e FTAz respectivamente. O grupo FTAz foi o único a não apresentar diferença estatística quando comparado ao grupo SHAN, indicando recuperação funcional dos animais tratado com associação do bioproduto baseado no OEAz e cinesioterapia. A análise histomorfológica indicou predominância do colágeno tipo III caracterizada como frequente e tipo I como razoável no grupo FTAz, com aumento da espessura do colágeno no grupo CTR. Encontrou-se forte e inversa correlação entre espessura do colágeno tipo I do perímio com os testes comportamentais BBB e CM. Assim, pode-se concluir que a utilização de exercícios fisioterápicos associado ao bioproduto à base do OEAz mostrou-se eficaz para reverter as alterações na espessura e organização do colágeno causadas pela espasticidade após LM em modelo murino.

Palavra-chave: *Alpinia*; fisioterapia; espasticidade muscular; lesão medular; colágeno.

ABSTRACT

The spinal cord injury (SCI) is a neurological condition that involves partial or total neuronal traffic interruption by the spinal cord and can result in several physical disability. Spasticity is

the most disabling disorder for an individual because limits patient mobility and functionality. It is known that changes in muscle collagen are present in spastic muscles. Bioproduct based the essential oil of *Alpinia zerumbet* with antispasmodic and regulatory action of the muscle calcium concentration. Thus, this study objective was to evaluate the bioproduct based the essential oil of *Alpinia zerumbet* application effect in rats spastic muscle tissues. This is an experimental research conducted with 30 Wistar rats divided into five groups of six animals: Az group, FT, FTAz, CTR (without treatment) and SHAN (without spinal cord injury). It was proceeded laminectomy at the ninth thoracic vertebra level followed by compressive spinal cord injury (except with SHAN group). Behavioral analyzes were performed to identify neurological dysfunction absence at the SHAN group, as well as full recovery after 21 and 28 days of Az and FTAz groups, respectively. The FTAz group was the only one that presents no statistical difference when compared to the SHAN group. The histomorphological analysis indicated frequent predominance of type III collagen and reasonable of type I at FTAz group. Thus, it can be concluded that the bioproduct based the essential oil of *Alpinia zerumbet* use associated with physical therapy was.

Keywords: *Alpínia*; Spasticity; Physical Therapy, Spinal Cord Injury; *Collagen*.

1 INTRODUÇÃO

A medula espinhal é a estrutura neural responsável por conduzir impulsos elétricos, aferentes e eferentes, entre o encéfalo e o corpo. Localizada dentro do canal medular, a medula espinhal é comumente lesionada em casos de traumas diretos ou indiretos na coluna vertebral, e pode resultar em déficit motor e sensitivo, repercutindo com limitação funcional para o indivíduo (SILVA et al., 2012).

A lesão medular (LM) acomete primordialmente adultos jovens, entre 15 e 30 anos, cursando com paraplegias em 70% dos casos e tetraplegia em 30%. Estas sequelas apresentam-se parciais ou completas, limitando a independência funcional destes indivíduos. Quanto às causas da LM, as lesões traumáticas, como os acidentes automobilísticos, representam 42% do total de traumas medulares. (BRASIL, 2012).

Para um paciente com LM, a espasticidade representa o maior fator limitante de sua mobilidade e, conseqüentemente, de sua independência funcional. Caracterizada pelo aumento dos reflexos miotendinosos que resultam em incremento do tônus muscular patológico, a espasticidade restringe a mobilidade articular, e tende a evoluir para contraturas neuromiogênicas comprometendo a funcionalidade do indivíduo (BRASIL, 2012; SORIANO et al., 2012).

Uma das características do músculo espástico é o incremento da quantidade de colágeno intramuscular, em especial do tipo I, bem como aumento da espessura do colágeno presente, o que reduz a extensibilidade muscular, além de contribuir para o aumento da

contratura e rigidez passiva (SMITH, 2011). Segundo Booth et al. (2001), o colágeno, por ser uma proteína estrutural responsável pela manutenção da fisiologia muscular tem importante influencia na condição funcional do músculo espástico.

O tratamento da LM é composto de exercícios de fisioterapia que inibem a ativação do fuso neuromuscular minimizando os efeitos da espasticidade. Técnicas fisioterapêuticas auxiliam ainda no fortalecimento muscular, otimizando o controle de tronco e, conseqüentemente a capacidade de manutenção postural. Além dos exercícios, alguns medicamentos auxiliam a regulação do tônus muscular, minimizando a característica espástica da lesão, como os benzodiazepínicos, cloridrato de imipramina, gabapentina e toxina botulínica tipo A. Estes tratamentos beneficiam não apenas a saúde física do indivíduo, como também sua condição psicossocial, uma vez que a limitação da mobilidade é um fator significativo de exclusão social (SILVA et al., 2012).

A fitoterapia pode representar uma alternativa eficiente no tratamento de diversas disfunções, como a espasticidade. Conhecida como colônia, devido ao seu odor característico, a *Alpinia zerumbet* (Az) é uma planta herbácea, da família Zingiberaceae, comumente encontrada no nordeste brasileiro, popularmente utilizada como diurético, sedativo e hipotensor (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004). Dentre os efeitos terapêuticos dos derivados da Az já pesquisados, pode-se destacar a sua ação sobre a modulação da concentração do cálcio, bem como a atividade antiespasmódica e de relaxamento do tônus basal (BEZERRA et al., 2000; CÂNDIDO; XAVIER-Filho, 2010). Essa característica induz ao relaxamento muscular com normalização do tônus, podendo representar benefício para diversas condições clínicas, a exemplo da espasticidade (BEZERRA et al., 2000).

As musculaturas espásticas apresentam alterações na tensão passiva, bem como de suas propriedades intrínsecas, envolvendo o colágeno, titina e a matriz celular. Baseado em estudos de Lieber et al. (2003) e Olsson et al. (2006) pressupõem-se que aja uma ação da Az nas fibras musculares e no colágeno dos músculos espásticos ocasionado pela contratura miogênica.

Por acometer principalmente indivíduos em idade produtiva e impor sequelas motoras restritivas e incapacitantes, o traumatismo medular deve ser alvo de atenção das políticas públicas de saúde. Sendo assim, a utilização de um bioproduto com potencial para melhorar a funcionalidade destes indivíduos pode gerar impactos econômicos e sociais (SCHMIDT et al., 2013). Desta forma, a proposta desta pesquisa foi avaliar os efeitos da cinesioterapia associada a um bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre o colágeno de tecidos musculares espásticos em modelo murino.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos da cinesioterapia associada a um bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* sobre colágeno de tecidos musculares espásticos em modelo murino.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar possíveis alterações funcionais e comportamentais de animais com músculos espásticos após a realização da cinesioterapia associada a um bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*.
- Identificar alterações histomorfológicas do colágeno nos músculos espásticos após a realização da cinesioterapia associada a um bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Medula espinhal, lesão medular

A medula espinhal é uma estrutura neural, de formato alongado e cilíndrico, responsável por conduzir impulsos elétricos, aferentes e eferentes, entre o encéfalo e o corpo. Localizada no interior do canal vertebral, é composta por células, denominadas neurônios com seus axônios se projetando pelos forames neurais, formando as fibras nervosas dos nervos periféricos (DEFINOS, 1999).

Apesar de ser classificada como componente do sistema nervoso central, não há divisão física entre a medula espinhal e as raízes nervosas, classificadas como sistema nervoso periférico. Esta continuidade ocorre em todo sistema nervoso, conferindo uma continuidade mecânica característica. Além disso, um impulso elétrico gerado no córtex cerebral, independente da sua intensidade, percorre todo sistema nervoso, atingindo necessariamente seu destino, sem necessidade de geração de novos impulsos pelo caminho, caracterizando assim uma continuidade elétrica a este sistema (WALSH, 2010).

Essa característica contínua do sistema nervoso é observada em casos de lesão neural, a medida em que uma afecção localizada em uma determinada região pode afetar órgãos e estruturas em diversos outros pontos do corpo. Qualquer dano causado à medula espinhal, independentemente do nível, capaz de comprimir ou romper os tratos axonais e, dessa forma, restringir a comunicação entre encéfalo e o restante do corpo é definido como LM (NSCISC, 2011). Trata-se de uma condição neurológica que envolve a interrupção parcial ou total do trânsito neuronal pela medula espinhal, de início súbito, comumente por causas traumáticas, com significativa repercussão do ponto de vista orgânico e psicológico. (CAMPOS et al., 2008).

A LM, acomete uma significativa parcela da população mundial. Somente no Brasil, estima-se em 50 casos novos para cada um milhão de habitantes. Em 2010 foram, aproximadamente 96.000 novos casos de LM com sequelas motoras (SILVA et al., 2012). Por acometer principalmente indivíduos adultos-jovens do sexo masculino, entre os 16 e 30 anos, e impor sequelas motoras restritivas e incapacitantes, por muitas vezes irreversíveis, o traumatismo medular deve ser alvo de atenção das políticas públicas de saúde (ANDRADE; GONÇALVES, 2007; SHAH; TISHERMAN, 2014)

A sequela motora e sensitiva causada por uma lesão medular é determinada pelo seguimento vertebral acometido: traumas cervicais geram lesões classificadas como alta, tendendo a evoluir com tetraplegia, enquanto traumas toracolumbares evoluem comumente com paraplegias e são classificados como lesões baixas. Este acometimento resulta em déficit total ou parcial da força muscular e da sensibilidade (FERREIRA; MARINO; CAVENAGHI, 2012; SULLIVAN; SCHMITZ, 2004).

Na maioria dos casos de LM o mecanismo primário é a compressão aguda ou a laceração da medula espinal devido a um deslocamento ósseo. Em seguida, vários eventos podem ser observados, incluindo interrupção do impulso nervoso, hemorragia e perda da autorregulação sanguínea. Entre os componentes secundários, a isquemia é considerada um dos fatores mais importantes implicados na lesão do tecido neuronal, ocorrendo de 01 a 04 semanas pós lesão, o que forma um tecido cicatricial e cistos intramedulares, ocasionando a morte de axônios e células nervosas que não foram inicialmente lesadas (DASARI, 2014). Além deste componente, o influxo de íons e o aumento da pressão sanguínea favorecem a apoptose neural e, conseqüentemente, a necrose neuronal (FERREIRA; MARINO; CAVENAGHI, 2012).

3.2 Espasticidade

Dentre as repercussões motoras decorrentes da LM, a espasticidade é o transtorno mais incapacitante para o indivíduo. Associada à síndrome do neurônio motor superior, a espasticidade é um conjunto de sintomas caracterizados pela exacerbação dos reflexos de estiramento e osteotendinosos, o que resulta em hiperreflexia e aumento do tônus muscular (SORIANO et al., 2012). Considera-se espasticidade uma desordem neuromotora caracterizada com aumento, velocidade-dependente, da resistência muscular ao alongamento e/ou movimento passivo. Esta alteração tônica afeta a independência funcional do indivíduo lesado, dificultando a execução de tarefas normalmente simples como alimentação, locomoção e cuidados de higiene pessoal, afetando socialmente e psicologicamente o paciente (BARNES et al., 2003).

Segundo Olsson et al. (2006) e Roy et al. (2012), os músculos espásticos apresentam alterações estruturais caracterizadas pela redução do comprimento dos sarcômeros em série

e, consequentemente, redução no comprimento e no volume do ventre muscular, aumento do número de fibras do tipo IIX, aumento de tecido conjuntivo extracelular e variação na isoforma titina.

O entendimento da espasticidade perpassa pelo conhecimento prévio da contração muscular fisiológica. De acordo com Oliveira (2009), uma contração muscular normal acontece com a elevação dos níveis de Ca^{++} , induzindo a ligação entre tropomiosina e actina, gerando tensão e/ou encurtamento do sarcômero. Para atingir o relaxamento muscular ocorre a recaptação do Ca^{++} , reduzindo sua concentração no citosol e desativando as pontes cruzadas da cadeia da miosina. Gordon et al. (2000) e Cheng; Lederer (2008) relatam que o excesso de Ca^{++} no citosol causa lesões extensas e alterações nas propriedades contráteis dos músculos, além de aumentar a tensão passiva e reforçar as ligações cruzadas, perpetuando o aumento do tônus muscular patológico.

Outro componente que provavelmente estará alterado devido à espasticidade é o colágeno. No músculo normal, o colágeno é altamente organizado em torno de fascículos ou grupos de miofibrilas, o perimísio, e em torno de miofibrilas individuais, o endomísio. Ambos apresentam papéis importantes na transdução de força e rigidez muscular (BOOTH et al., 2001). Segundo Imamura et al. (1999), o colágeno apresenta importante função estrutural, que garante alinhamento através das ligações das fibras musculares. A força e tensão do colágeno decorrem das ligações cruzadas inter e intramoleculares, da orientação de seus feixes, das forças de fricção, da densidade entre as fibrilas, e interação com componentes da matriz extracelular. Dessa forma, permite que o músculo funcione como uma unidade de força de contração.

É possível que alterações morfológicas do colágeno, tanto no perimísio como no endomísio, altere a mecânica muscular, podendo contribuir diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento de contraturas, desempenhando assim um papel importante em problemas de mobilidade de pacientes espásticos (DIETZ; SINKJAER, 2007).

De acordo com Lieber et al. (2003), os músculos de indivíduos com espasticidade apresentam alta densidade de matriz extracelular. Porém essa matriz apresenta-se com capacidade mecânica inferior devido à perda da disposição em paralelo das fibras de colágeno, assumindo um arranjo aleatório. Essas alterações também foram descritas por Gracies (2005) nos músculos espásticos, que apresenta o reflexo de estiramento passivo aumentado devido às alterações no colágeno. Estudos histopatológicos demonstram outras relações entre espasticidade e colágeno: há um incremento na densidade de colágeno, devido ao aumento do tecido conjuntivo extracelular nos músculos espásticos, o que pode estar relacionado a uma maior resistência passiva dos elementos musculares não contráteis ao estiramento (GRACIES; 2005).

3.3 Tratamento

3.3.1 Tratamento medicamentoso

O tratamento farmacológico da espasticidade pode incluir medicamentos orais, bloqueios químicos e bomba intratecal, com objetivo de normalizar o tônus, favorecendo a funcionalidade dos pacientes (BRASHEAR; LAMBETH, 2009).

O baclofeno é amplamente utilizado em casos de espasticidade pós LM em adultos (TILTON, 2009). Atua nos receptores GABA, sendo agonista dos receptores GABAB pré e pós sinápticos, o que inibe reflexos medulares mono e polissinápticos. Gera ainda depressão do sistema nervoso central por meio de uma diminuição dos neurotransmissores glutamato e aspartato (GRACIES et al., 2008).

Também agindo nos receptores GABA o diazepam é a mais antiga medicação empregada no tratamento da espasticidade de origem medular e cerebral, sendo, ainda hoje, amplamente utilizado. Seu efeito indireto pré e pós sináptico, aumenta a afinidade desses receptores ao GABA endógeno (BRASHEAR; LAMBETH, 2009).

A tizanidina, medicamento também utilizado em sequelas espásticas pós LM, diminui os reflexos polissinápticos (estiramento tônicos) provavelmente pelo decréscimo da liberação dos neurotransmissores excitatórios pré-sinápticos. É um medicamento derivado imidazólico que age nos receptores alfa 2 adrenérgicos e imidazólicos da medula (GRACIES et al., 2008)

Estas medicações apresentam contra-indicações e efeitos adversos, podendo causar seção excessiva, alucinações, hipotensão ortostática e alterações oftalmológicas. A avaliação da função renal e hepática deve ser realizada de forma frequente para prevenir lesões nestes órgãos (PATEL; SOYODE, 2009).

A toxina botulínica é um complexo proteico purificado utilizada em forma injetável diretamente sobre o músculo espásticos a ser tratado, capaz de bloquear a liberação de acetilcolina, induzindo o relaxamento muscular. Porém, por inibir a contração muscular, a toxina pode reduzir a funcionalidade do indivíduo, prejudicando marcha e atividades funcionais (GRAHAN et al., 2000; HEINEN et al., 2006; WARD, 2008).

Os fitoterápicos, medicamentos obtidos através do uso exclusivo de matérias-primas de origem vegetal, possuem diferentes formas de apresentação e podem ser utilizados por variadas vias de administração: por via oral, na forma de pó para diluição, decocções, infusões ou chás; por via tópica, na forma de preparações à base de água ou óleo (WAGNER; WISENAUER, 2006). Uma das formas de utilização terapêutica das plantas é através dos seus óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos. Obtidos de diferentes materiais vegetais como flores, folhas, frutos e raízes originam-se do metabolismo secundário, sendo uma excelente forma de aplicação tópica por apresentarem bom índice de absorção (GEROMINI et al., 2012).

O medicamento fitoterápico apresenta um custo relativamente alto de pesquisa e produção, não devendo ser confundido com medicina popular ou alternativa. Os fitofármacos são submetidos a intensa fiscalização e controle por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comprovação dos seus efeitos benéficos, enquanto a medicina popular perpassa apenas pelos conhecimentos empíricos de uma população, não havendo estabelecimento de critérios científicos em sua utilização. Sendo assim, se faz necessário o investimento em pesquisas dos recursos vegetais existentes no Brasil, com o objetivo de identificar possíveis benefícios de seu uso para a população, bem como avaliar sua reprodutibilidade, eficácia e segurança do seu uso (REZENDE; COCCO, 2002; VIEIRA et al., 2010).

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre os fitoterápicos, ainda não se conhece um produto natural que atue efetivamente em músculos espásticos, de forma tópica, para pacientes com LM.

3.3.2 Cinesioterapia

A cinesioterapia é um recurso que utiliza a movimentação articular, de forma passiva ou ativa, largamente utilizada na fisioterapia. A cinesioterapia ativa depende necessariamente da contração muscular do paciente com objetivo de proporcionar ganho da força, potência e resistência à fadiga. Já a cinesioterapia passiva tem por finalidade o aumento da extensibilidade tecidual com consequente ganho da amplitude de movimento (KISNER; COLBY, 2009).

No paciente com LM, a cinesioterapia é utilizada desde o pós-operatório imediato, devendo ser mantida durante toda a reabilitação. Trata-se de uma modalidade terapêutica de consenso na literatura para o controle da espasticidade. Sua aplicação precoce aumenta o fluxo sanguíneo e a liberação de oxigênio para os tecidos, causando mudanças no sistema musculoesquelético e cardiovascular, atuando assim nas incapacidades secundárias e na reeducação neuromotora (SHERWOOD et al., 2000).

Entre as técnicas utilizadas na cinesioterapia com objetivo de normalizar o tônus muscular e melhorar a amplitude de movimento, a movimentação passiva contínua (MPC) é a mais comum na fisioterapia. Através de movimentos lentos e contínuos, realizados de forma passiva com flexão de tornozelo, joelho e quadril, também denominada de tríplice flexão, a MPC ativa estruturas neuronais localizadas na transição miotendinosa denominada de órgão tendinoso de golgi (OTG) (KLIMKIEWICZ et al., 2013).

Ainda segundo Klimkiewicz et al. (2013), o OTG é um proprioceptor encapsulado nas fibras dos tendões musculares, sensível às variações do comprimento do tendão. Quando estirado, o OTG deforma-se e envia estímulos inibitórios provocando relaxamento muscular.

Assim, a ativação deste receptor através dos exercícios passivos é comumente utilizado como recurso fisioterápico em pacientes espásticos pós LM.

A cinesioterapia apresenta capacidade de alterar a estrutura muscular à medida em que influencia a estrutura e o comportamento mecânico do músculo (LEARDEMAN, 2007). Segundo Bahr et al. (2006) a movimentação passiva auxilia no alinhamento das fibras de colágeno, favorecendo o reparo tecidual e a extensibilidade muscular.

Benefícios psicológicos também são observados após tratamento cinesioterápico. A possibilidade da realização de movimentos articulares, mesmo que passivamente, para pacientes plégicos ou paréticos, promove bem estar, melhorando assim a auto estima do indivíduo (ARAUJO et al. 2012).

3.4 *Alpinia zerumbet* e o bioproduto

Conhecida popularmente como “Colônia” devido ao aroma intenso e adocicado exalado por suas folhas, a *Alpínia speciosa*, ou *Alpinia zerumbet*, vem sendo profundamente estudada, já sendo de conhecimento científico diversos efeitos do seu óleo essencial (KRIECK et al., 2008). Pertencente à família *Zingiberaceae*, apresenta-se com folhas alternadas, completas e simples, com caules aéreos e curtos agrupados em touceiras, podendo atingir 1,5 a 2,5 metros (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004). Suas flores são alvas com lacínios róseos no ápice, dispostas em cachos grandes levemente aromatizadas, apresentando seus frutos em formato de cápsula (KRIECK et al., 2008).

Entre os diferentes componentes químicos inerentes do OEAz responsáveis por alguns dos seus efeitos terapêuticos, encontram-se flavonóides, taninos, fenóis, e alcaloides (MENDONÇA et al, 1991; ALBUQUERQUE; NEVES, 2004). O componente majoritário é o terpeno-4-ol, presente em todos os órgãos em quantidades diferentes. Já o α -terpeno é o principal constituinte da flor e o 1,8 cineol da folha (ELZAAWELY, 2007).

O terpeno-4-ol possui atividade relaxante, atribuída ao possível antagonismo aos canais de cálcio, bem como efeito miogênico, relaxante e anticolinérgico a estes compostos (BEZERRA et al., 2000; NASCIMENTO, 2005). Quanto ao veículo de aplicação do terpeno-4-ol, a solução oleosa apresenta melhor resultado de absorção quando comparados a emulsão ou o hidrogel. Estudos de Cal (2006a) encontraram valores de absorção de 90 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, em solução oleosa, 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em emulsão e 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em hidrogel, em dose de 0,75%. O tempo de melhor absorção foi de 1 hora, para fármacos e cosméticos por via dérmica, com 10 a 20% de absorção desses terpenos aplicados pelo corpo.

Os monoterpênicos 1,8 cineol interagem com os lipídios e a queratina favorecendo a solubilidade dos medicamentos transdérmicos (CAL, 2006b; SAPRA et al., 2008). Entre seus efeitos destaca-se sua característica anti-inflamatória e mucolítica (JÄGER et al., 1996;

JUERGENS et al., 2003; JUERGENS et al., 2004). A atividade anti-inflamatória também é comum ao terpeno-4-ol e ao α -terpineol segundo os estudos de Khalil et al. (2004).

Autores pesquisaram os diversos efeitos deste fitoterápico como a atividade antifúngica (TAWATA et al., 1996) e antioxidante em frações metanólicas (MASUDA et al., 2000), atividade moluscicida e larvicida (LIMA, 2003), além de efeito hepatoprotetor do pó das sementes, demonstrando ação hipolipemiante e, conseqüentemente, reduzindo o colesterol.

Quando se relaciona o uso da Az com a contração muscular, a literatura apresenta importantes resultados como a ação anticolinérgica competitiva inibitória desta contração, a atividade antiespasmódica e relaxamento do tônus basal de íleo de ratos (BEZERRA et al., 2000), o efeito vaso-relaxante diminuição do tônus simpático (LAHLOU et al., 2002), além de modulação da concentração do cálcio no músculo liso, de forma dose dependente (NASCIMENTO et al., 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho da pesquisa

Estudo experimental, pré-clínico e controlado.

4.2 Animais

Utilizou-se 30 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultos, de ambos os sexos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Os animais permaneceram no referido biotério, em gaiolas de polipropileno padrão, agrupadas em número de 3, em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Os animais foram avaliados em seu comportamento funcional e neurológico e seu material biológico (gastrocnêmio direito) submetido a análise histomorfológicas. Ao final de cada experimento os animais foram anestesiados, sacrificados e, posteriormente, incinerados no Biotério da Universidade Tiradentes. O estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 030513 (ANEXO I) da referida universidade.

4.3 Bioproduto

O bioproduto à base do OEAz foi produzido, a partir da coleta de folhas verdes, transportadas em carro climatizado, tendo sido realizada a extração do seu óleo essencial por arraste a vapor e utilizado óleo vegetal como veículo, tendo sido registrado junto a ANVISA sob número 1.1557.0069.002-5.

Amostra do medicamento utilizado no presente estudo foi submetida à análise cromatográfica no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com objetivo de identificar a composição do produto.

O bioproduto foi analisado por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa (Shimadzu, Japão, QP 2010-plus) operando com energia de ionização de 70 eV e com uma massa contida no intervalo de 45-450 Da. Na identificação da constituição química foi empregada coluna capilar DB5 (Agilent Technologies, EUA) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de filme de espessuras de fase estacionária. Foi empregado um fluxo de gás de 1 mL/min de hélio (ultrapura, Linde Gases, Brasil). A temperatura do detector e do injetor foi mantida a 250°C, iniciando o aquecimento a 40°C, com acréscimo de 3°C/min, até atingir 220°C.

A composição relativa dos óleos foi obtida partindo do princípio de que a soma de todas as áreas de composto foi de 100%, e fatores de resposta não foram tomados em consideração devido à falta de padrão comercial disponível. Os compostos foram identificados por tentativa, comparando seus índices de retenção, obtidos experimentalmente pela temperatura linear programada (LPTRI) com os relatados na literatura. Os espectros de massa dos compostos de óleos essenciais também foram comparados com os relatados no NIST (versão 107) e Wiley (versão 229) da biblioteca espectros de massa, e utilizando a descrição de espectros de massa de Adams (2007) como uma ajuda adicional na identificação.

4.4 Grupos experimentais e doses

Os 30 animais foram separados aleatoriamente e igualmente em cinco grupos da seguinte forma:

- Grupo Az: aplicação do bioproduto à base do OEAz sob dose 0,05ml/2Kg dividido igualmente em ambas as patas traseiras, aplicado por via dérmica nas panturrilhas;
- Grupo FT: realização de exercícios fisioterápicos passivos em ambas as patas traseiras, realizando tríple flexão com 2 séries de 10 repetições;
- Grupo FTAz: aplicação do bioproduto à base do OEAz sob dose 0,05ml/2Kg dividido igualmente em ambas as patas traseiras, aplicado por via dérmica nas panturrilhas, seguido de realização de exercícios fisioterapêuticos passivos em ambas as patas traseiras, realizando tríple flexão com 2 séries de 10 repetições;
- Grupo CTR: sem nenhum tipo de tratamento;
- Grupo SHAN: sem tratamento, tendo sido realizada a laminectomia, porém sem lesão medular.

Os tratamentos foram realizados nas patas traseiras devido ao nível de compressão medular (T9/T10) gerar sequela motora nesta região.

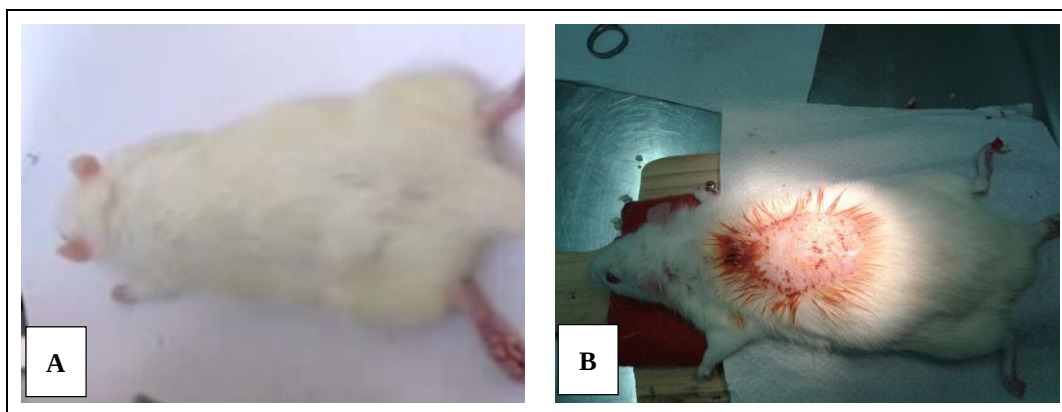
4.5 Procedimento cirúrgico

O modelo de lesão medular baseou-se no experimento de Torres et al. (2010) e Osborn et al. (1990), seguindo as normas de pré e pós-operatório do *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS). Os animais foram pesados e, em seguida, anestesiados com Cloridrato de Ketamina a 10% (95mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal.

Após anestesia os animais foram posicionados em decúbito external com o dorso exposto (Figura 1A) para realização de tricotomia e antissepsia da região torácica, com solução de polivinil pirrolidona iodo (Figura 1B). Em seguida, realizou-se incisão de, aproximadamente, 5cm de pele e tecido subcutâneo sob a linha média da região torácica, com afastamento subperiosteal da musculatura perivertebral, objetivando exposição da coluna vertebral (Figura 1C).

Para exposição do canal medular, foi feita a localização das vértebras T9 e T10 através da palpação da última costela e realizada a laminectomia destes seguimentos. Neste momento reproduziu-se o trauma mecânico utilizando um aparelho estereotático modificado, confeccionado pelos pesquisadores composto de uma haste fina de ponta romba (1mm²) com peso acoplado de 70g por 5 minutos (Figura 1D).

Posteriormente procedeu-se a sutura da camada muscular e pele com fio 4.0 de poliamida monofilamento não absorvível sendo aplicado antibioticoterapia profilática com Pentabiol a 0,1ml/100g, por via intraperitoneal. Ao final da cirurgia os animais foram acomodados em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, em ambiente climatizado.



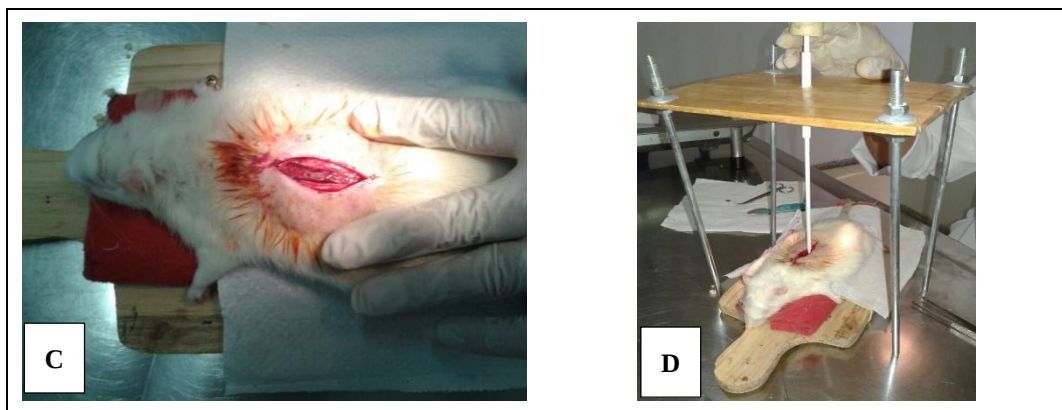


Figura 1: A) Posicionamento do animal; B) Tricotomia e antissepsia da região; C) Exposição da coluna vertebral; E) Utilização do aparelho estereotáxico modificado para lesão medular.

4.6 Protocolo de tratamento

Os animais dos grupos Az, FT e FTAz iniciaram tratamento diário no 15º dia pós-operatório (DPO), quando a espasticidade tornava-se presente (BENNETT et al., 2004), sendo mantidos até o 45º DPO, totalizando 30 dias de tratamento. Realizou-se a massagem abdominal com o objetivo de esvaziar a bexiga e a defecção, quando necessário.

4.7 Protocolo de avaliação

A avaliação abrangeu características comportamentais e histológicas dos animais. Os testes funcionais para avaliação comportamental e neurológica foram realizados em 8 momentos: 4 antes do início dos tratamentos (no 01º, 03º, 07º, 14º DPO) e 4 após este momento (no 21º, 28º, 35º e 45º DPO). Assim possibilitou-se observar o comprometimento funcional e comportamental na lesão aguda, subaguda e crônica, além do quadro correspondente à hipotonia e hipertonia, semelhantes aos indivíduos acometidos com LM. As avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador, amenizando possíveis variações nos resultados obtidos.

Utilizou-se 5 testes para compor a avaliação comportamental e neurológica: o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), o teste de sensibilidade dolorosa (SD), a capacidade motora (CM), o posicionamento proprioceptivo (PP) e tátil (PT).

Para realização do BBB, foi utilizada uma escala de avaliação locomotora padronizada (ANEXO II). Os itens avaliados foram: os movimentos das patas, sua coordenação, firmeza e comportamento do tronco. Seus subitens versam sobre o movimento do membro posterior, posição do tronco, abdome, posição da pata, caminhada, posição predominante da pata, instabilidade do corpo e rabo. O BBB é composto por 22 escores, variando de 0 (ausência total de movimentos) a 21 (movimento normal). Para este teste cada rato foi colocado em um campo aberto, cercado por acrílico permitindo total visualização, sendo avaliado por dois minutos (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995; SEDY, 2008).

Os demais testes foram descritos por Von Euler et al. (1996). Na avaliação da CM observou-se a atividade espontânea do animal em campo aberto e sem obstáculo, na dimensão de 1m² por 4 minutos. Caso fosse capaz de deambular com um déficit discreto, o animal era colocado em percurso de madeira com larguras reduzidas progressivamente, começando com 7,7cm e terminando com 1,7cm e progressão de 1cm entre elas, totalizando assim sete barras (Figura 2). Esse percurso foi posicionado a uma altura de 60 cm, com 1 metro de extensão. O escore varia de 0 a 12 seguindo a tabela 1.



Figura 2: Teste de capacidade motora sobre barra estreita.

Tabela 1. Escore de capacidade motora.

CAPACIDADE MOTORA (CM)	
0	Ausência de movimento nos membros pélvicos, sem apoio de peso
1	Movimento sutil, desconexo dos membros pélvicos, sem apoio de peso
2	Movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso
3	Apoio de peso nos membros pélvicos, deambulação com déficit acentuado
4	Deambulação com déficit moderado
5	Deambulação com déficit discreto e não anda na barra de 7,7cm
6	Deambulação normal ou com déficit discreto e anda na barra de 7,7cm
7	Consegue deambular na barra de 6,7cm
8	Consegue deambular na barra de 5,7cm
9	Consegue deambular na barra de 4,7cm
10	Consegue deambular na barra de 3,7cm
11	Consegue deambular na barra de 2,7cm
12	Consegue deambular na barra de 1,7cm

No teste SD fez-se uma pressão na prega interdigital das patas traseiras, utilizando uma pinça hemostática de *Halsted* fechada na primeira cremalheira. A resposta varia de acordo com a tentativa ou realização de morder, vocalizar e/ou a velocidade de retirada da pata (Figura 3).



Figura 3. Teste de sensibilidade dolorosa.

A avaliação PP foi utilizada para verificar a agilidade e precisão que o animal tem para retornar a posição normal, quando sua pata é colocada em flexão, proporcionando o contato do dorso da referida pata com o chão (Figura 4A). Enquanto no PT, o dorso da pata foi colocado em contato com a borda lateral da mesa, sendo avaliada a precisão e agilidade com que o animal irá colocar sua pata na superfície da referida mesa (Figura 4B).

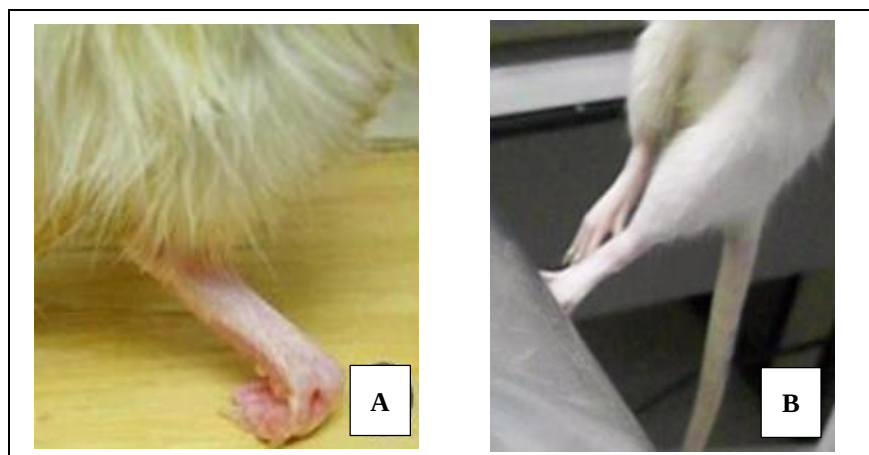


Figura 4: A) Teste de posicionamento proprioceptivo; B) Teste de posicionamento tátil.

Os testes SD, PP e PT apresentam escore classificado como 0 (ausência de reação), 1 (reação diminuída) e 2 (reação normal). Todos os testes realizados foram filmados e avaliados posteriormente para evitar erros nas determinações de seus escores. Após analisados, os valores foram organizados em um banco de dados para melhor visualização dos resultados, levando em consideração a pata com maior acometimento.

4.8 Análise histomorfológicas

Após o 45° DPO os ratos foram eutanasiados e os gastrocnêmios retirados e embebidos em formol a 10%. O material biológico passou por um processo de desidratação

e clareamento em álcool e xilol por um período total de 6 horas, sendo três imersões de uma hora em cada produto. Posteriormente fez-se a inclusão em parafina para confecção de 5 secções histológicas seriadas de 5µm de espessura, separadas entre si por uma distância de 10µm. Para análise histomorfológica do tecido muscular analisou-se as secções histológicas coradas em Picrossírius, segundo Albuquerque Júnior et al. (2009).

Para análise do padrão de neoformação do colágeno, utilizou-se um polarizador para luz transmitida (45 MM U-POT, Olympus) acoplado ao microscópio trinocular CX31 (Olympus), com sistema de captura de imagens C-70070 WIDE ZOOM (Olympus). Em cada lâmina foram fotomicrografados cinco campos histológicos (ampliação de 100x), sendo as imagens digitalizadas por meio de software de captura Olympus 2000® e projetadas em monitor Samsung® de 14'. Para análise descritiva do padrão de formação do colágeno foi analisada as seguintes variáveis: birrefringência (esverdeada ou amarelo-esverdeada para colágeno tipo III imaturo, e alaranjada ou avermelhada para colágeno tipo I maduro); espessura (delgada/delicada ou espessa/grosseira); e disposição (ondulada ou estirada).

A leitura do colágeno foi qualitativa tendo como observação a prevalência, em porcentagem, do colágeno tipo I e III encontrado em cada lâmina e apresentados baseando-se nos escores: 0 à 24% foi descrito como escasso; 25 à 49% razoável; 50 à 74% frequente; e 75 à 100% intenso.

Fez-se ainda a mensuração da espessura do colágeno muscular, tipo I e tipo III, localizado no perímio e no endomímio, nas imagens capturadas através do software AxioVision 105 color, expressas em micrômetro.

4.9 Análise estatística

A tabulação de dados e tabelas foi confeccionada pelo programa Microsoft Excel 2010. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prim 6.01. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade das variáveis estudadas. Para as análises de comparações múltiplas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn. Para verificar possíveis correlações entre as variáveis comportamentais e histomorfológicas utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Em todas as análises utilizou-se o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A análise cromatográfica do bioproduto à base do OEAz identificou 57 compostos totalizando 97,58% do total dos componentes, com retenção maior em nove componentes somando 78,43% do total da área cromatográfica. Os monoterpenos oxigenados são predominantes na composição do óleo essencial, e representam 45% do total do composto (Figura 5). Na análise cromatográfica destaca-se o terpeno-4-ol (23,23%), presente em todos

os órgãos da planta e o 1,8 cineol (21,77%), presente nas folhas, como os principais compostos identificados, além do γ -terpeno (11,63%) e p-cineol (5,85%). Os resultados da análise cromatográfica foram semelhantes aos encontrados por Craveiro et al. (1980) e Santos et al. (2011).

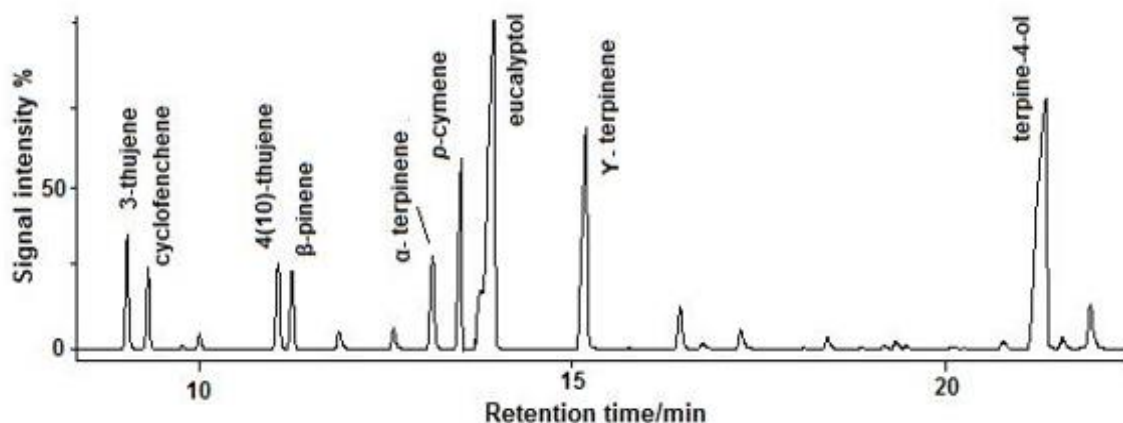


Figura 5: Componentes em destaque na análise cromatográfica do bioproduto à base do OEAz. Espectrometria de massa, coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), fluxo de gás hélio (1 mL/min), temperatura do detector e do injetor foi mantida a 250°C.

Na avaliação BBB pré-tratamento, todos os grupos submetidos à LM apresentaram escores semelhantes entre si. No 14° DPO o grupo SHAN apresentou os maiores escores quando comparado aos demais grupos, observando diferença significativa ($p < 0,001$), indicando a efetividade do procedimento de lesão experimental (Figura 6).

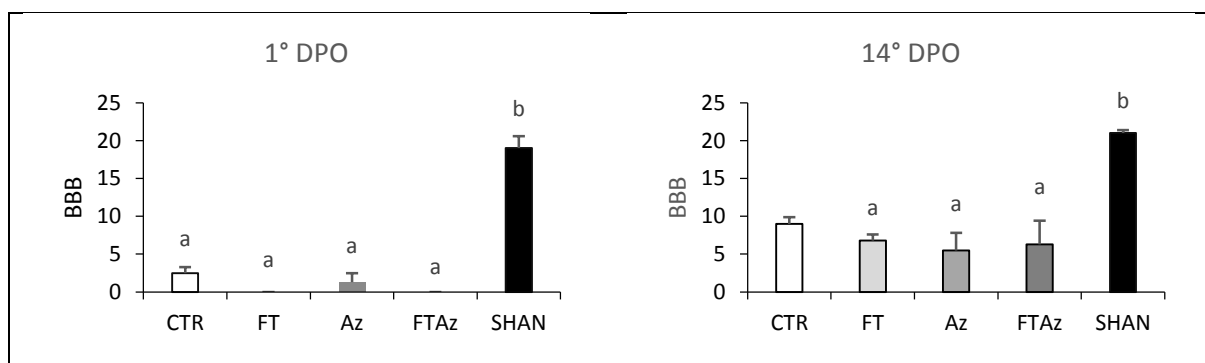


Figura 6: Comparativo do escore Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) intergrupos em músculos espásticos de ratos tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz em diferentes tempos pré tratamento. As barras representam a média, com seu respectivo desvio padrão, dos escores da avaliação BBB de cada animal em seu grupo. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

Nos tempos seguintes ao início do tratamento, os grupos SHAN e CTR apresentaram diferença significativa entre si em todos os tempos avaliados. Houve aumento gradual nos escores BBB dos grupos submetidos a algum tratamento a partir do 21° DPO. Nesta

avaliação, apenas os grupos CTR e FT apresentaram diferença significativa em relação ao grupo SHAN ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente), assim como na avaliação do 28° DPO. Na avaliação de 35 dias após a lesão medular o grupo Az também apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo SHAN ($p < 0,05$). Ao final do tratamento, na avaliação do 45° DPO, apenas o grupo FTAz apresentou valores diferentes estatisticamente ao grupo CTR ($p < 0,05$) e semelhantes ao grupo SHAN (Figura 7).

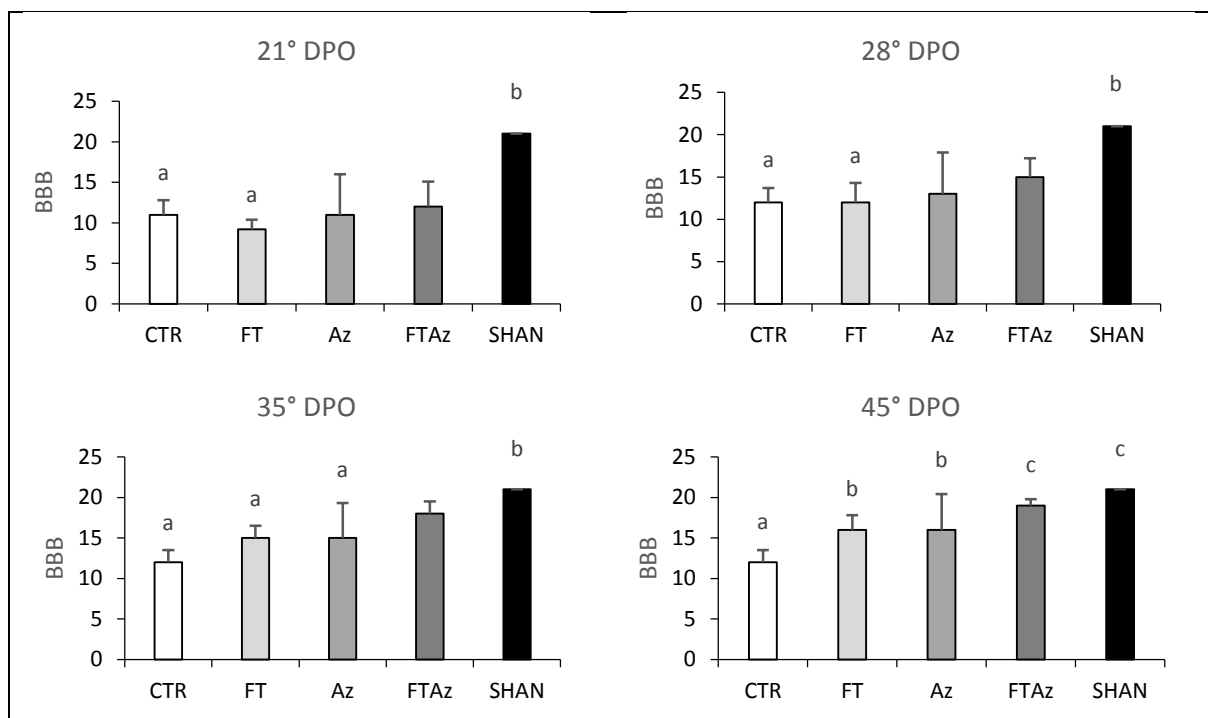


Figura 7: Comparativo do escore Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) intergrupos em músculos espásticos de ratos tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz em diferentes tempos pós início do tratamento. As barras representam a média, com seu respectivo desvio padrão, dos escores da avaliação BBB de cada animal em seu grupo. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

Na avaliação da Capacidade Motora, o grupo FTAz apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos CTR e FT em todos os tempos após o início do tratamento. A partir de 28 dia após à LM o grupo Az também apresentou diferença significativa comparado ao grupo CTR ($p < 0,05$), mantendo-se assim até o final das avaliações (Figura 8).

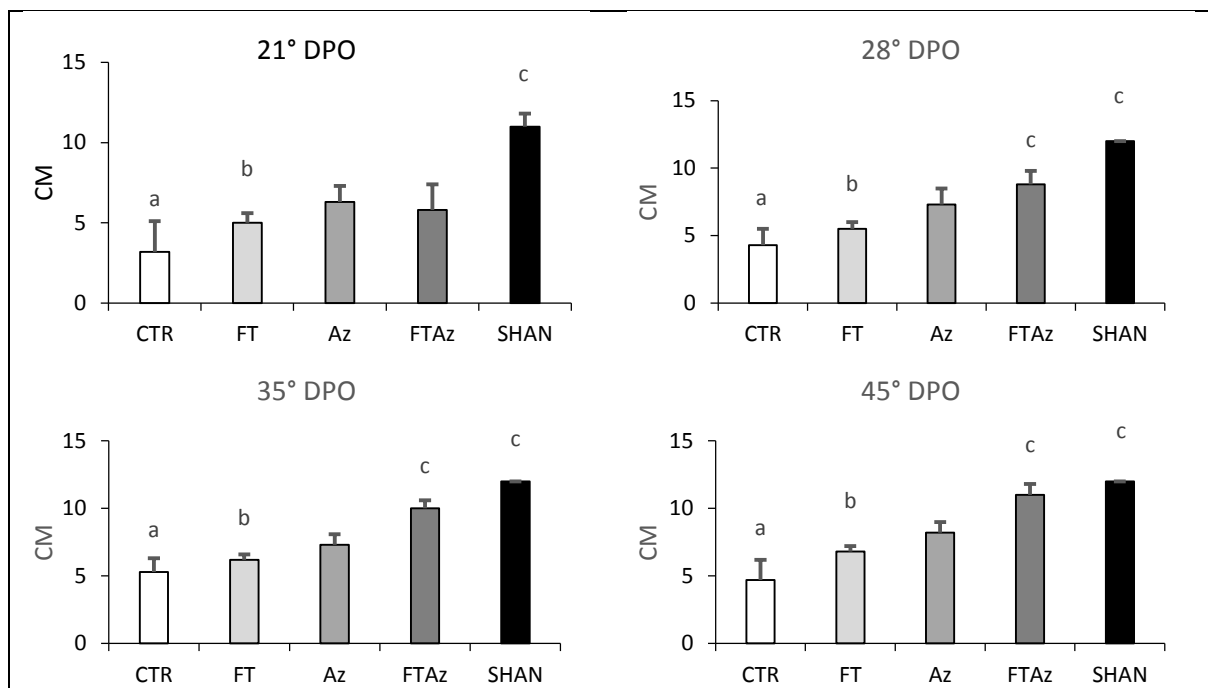


Figura 8: Comparativo do escore de Capacidade Motora (CM) intergrupos em músculos espásticos de ratos com alteração de colágeno, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproducto à base do OEAz nos diferentes tempos pós início do tratamento. As barras representam a média, com seu respectivo desvio padrão, dos escores de CM de cada animal em seu grupo. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

A avaliação neurológica, composta pelos testes de sensibilidade dolorosa, posicionamento tátil e proprioceptivo apresentaram valores máximos em todos os animais do grupo SHAN, a partir do 3°DPO, apresentando diferença estatística ($p < 0,01$) para os demais grupos. Já os animais do grupo CTR não atingiram escore classificado como normal em nenhuma das avaliações. No 21° DPO os grupos Az e FTAz apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo CTR ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente) na avaliação da SD, PP e PT. Ainda nestas avaliações todos os grupos tratados apresentaram valores de normalidade no 45° DPO. Porém, apenas o grupo FTAz apresentou todos os animais com valores normais de respostas já ao final da primeira semana de tratamento, no 21° DPO (Figura 9).

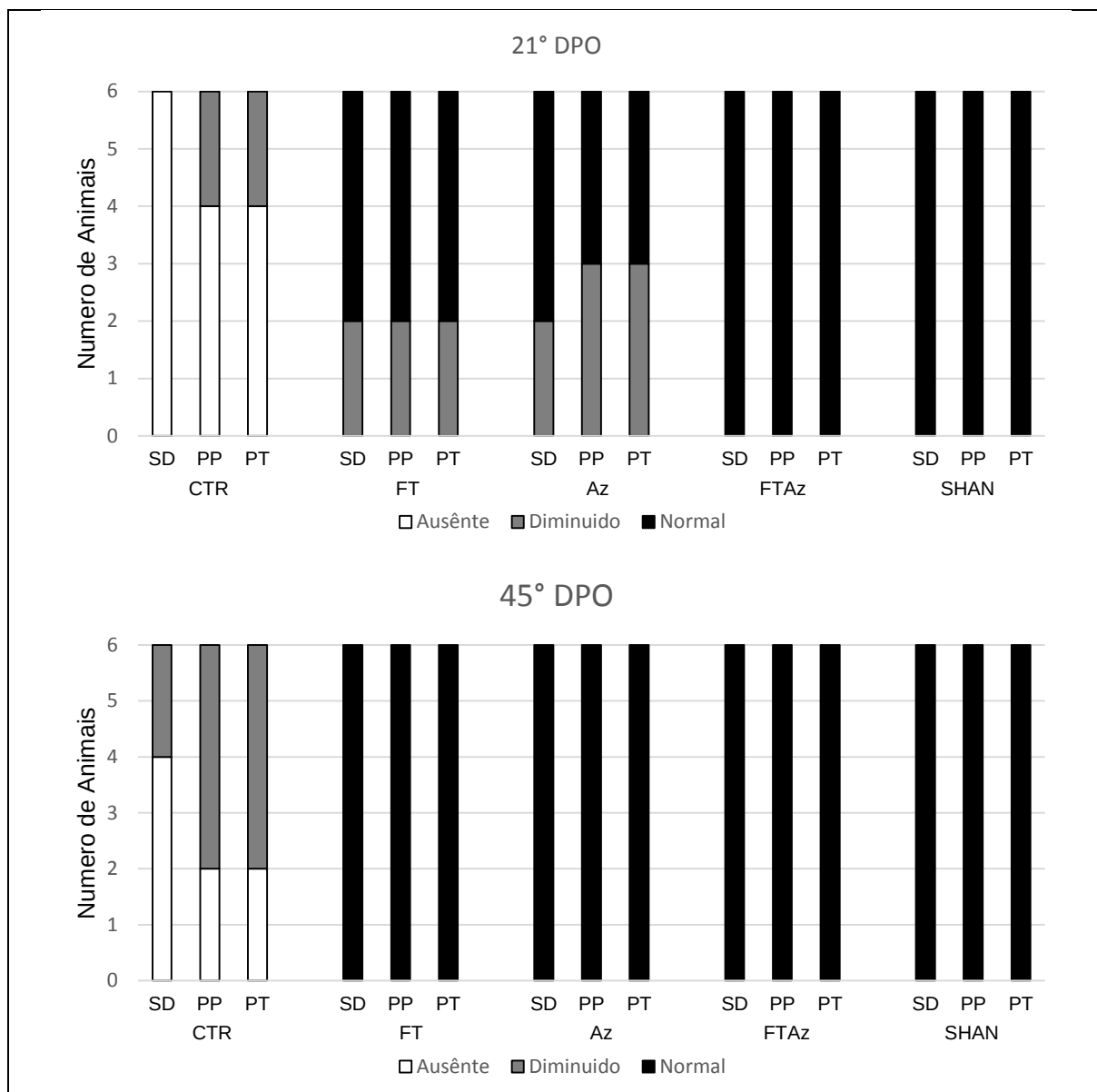


Figura 9: Comparativo do escore de Sensibilidade Dolorosa, Posicionamento Proprioceptivo e Posicionamento Tátil intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz nos tempos de 21 e 45 dias pós operatório.

Quanto a predominância do colágeno tipo I apresentou-se escasso no grupo SHAN (44%) e no grupo Az (56,25%), frequente no grupo FT (44,83%), e intenso no grupo CTR (51,79%), todos com $p < 0,001$. O Grupo FTAz obteve predominância razoável em 60% das lâminas com $p < 0,01$ (Figura 10).

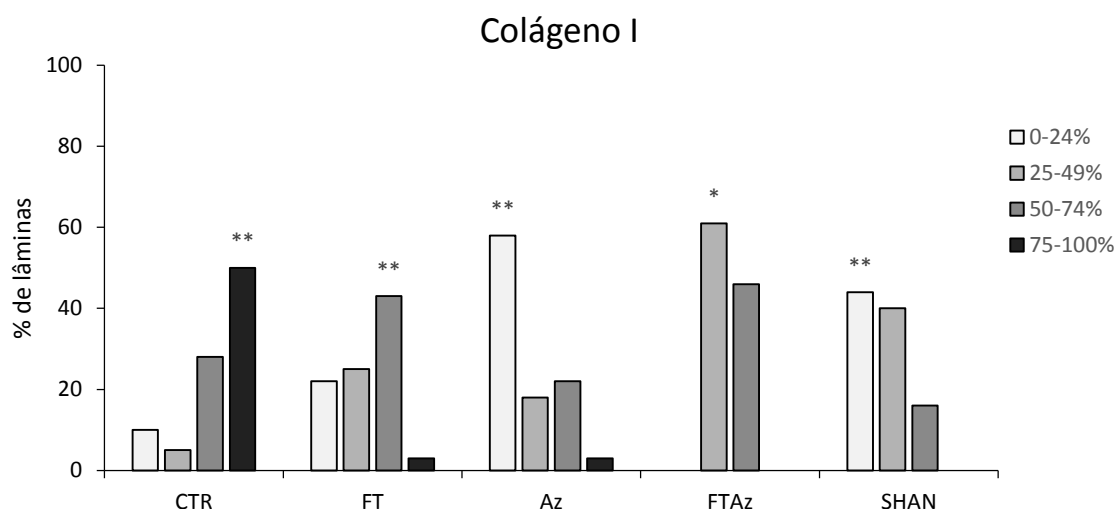


Figura 10: Predominância de colágeno tipo I intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. **Legenda:** * p<0,01; ** p<0,001. Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn.

A predominância do colágeno tipo III foi frequente nos grupos SHAN (52%), FT (68,97%) e no grupo FTAz (100%). No grupo Az classificou-se como intenso em 56,25%, enquanto no grupo CTR, apresentou-se escasso em 50%, todos com p<0,001 (Figura 11).

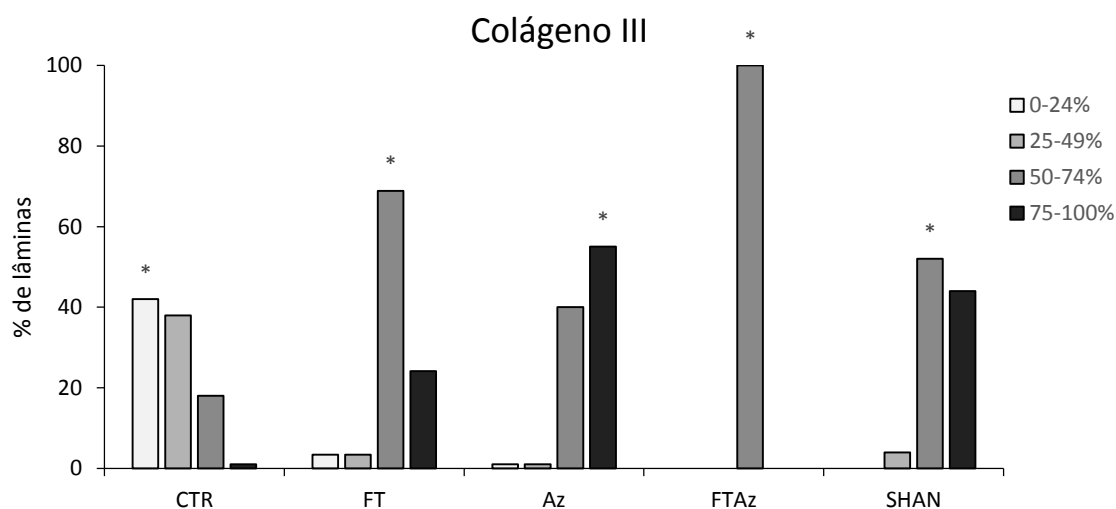


Figura 11: Predominância de colágeno tipo III intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. **Legenda:** * p<0,001. Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn.

Na mensuração da espessura do colágeno tipo I o grupo CTR apresentou o maior volume no endomísio quando comparado aos demais grupos, com diferença significativa (p<0,001). Valores semelhantes foram encontrados na mensuração do colágeno tipo I localizado no perimísio no qual o grupo CTR apresentou diferença significativa para o grupo

FT, com $p < 0,01$ e para os demais grupos, com $p < 0,001$. Os grupos SHAN, FT, FTAz e Az não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 12).

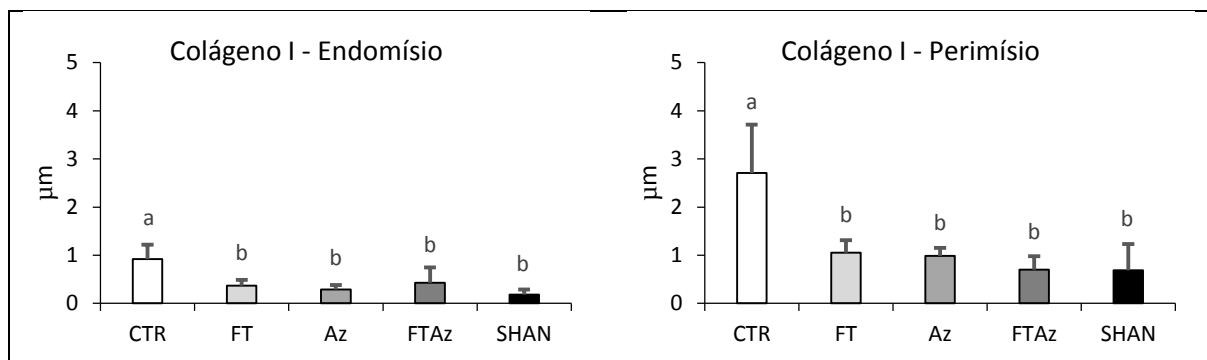


Figura 12: Espessura de colágeno tipo I localizado no endomísio ou perimísio em intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

Para o colágeno tipo III localizado no endomísio tanto o grupo CTR, FT, FTAz e Az foram significativamente diferentes do grupo SHAN. Na mensuração do colágeno tipo III localizado no perimísio, não houve diferenciação entre os três grupos tratados e o grupo SHAN. Porém, quando comparados ao grupo CTR todos apresentaram diferença significativa (Figura 13).

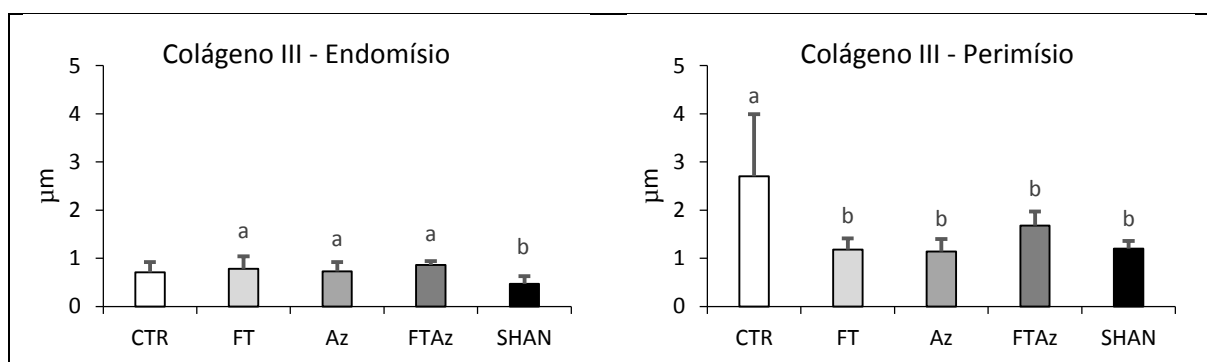


Figura 13: Espessura de colágeno tipo III localizado no endomísio ou perimísio em intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

Verificou-se a correlação entre os testes comportamentais, BBB e CM, do 45° DPO e a espessura do colágeno tipo I e tipo III localizado no endomísio e no perimísio (Tabela 2).

Tabela 2: Coeficiente de correlação entre colágeno tipo I e III localizados no perímio ou endomío e testes comportamentais (BBB e CM) em ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento.

	BBB	CM
Colágeno I – perímio	$\rho=-0,97^*$	$\rho=-1,00^*$
Colágeno I – endomío	$\rho=-0,66$	$\rho=-0,70$
Colágeno III – perímio	$\rho=-0,15$	$\rho=-0,20$
Colágeno III – endomío	$\rho=-0,05$	$\rho=-0,01$

Legenda: * $p<0,05$; Coeficiente de correlação de Spearman.

Obteve-se valores significativos ($p<0,05$) com correlação forte e inversa entre colágeno tipo I do perímio e escore BBB ($\rho=-0,97$), bem como entre este mesmo colágeno e o escore de CM ($\rho=-1$; Figura 14).

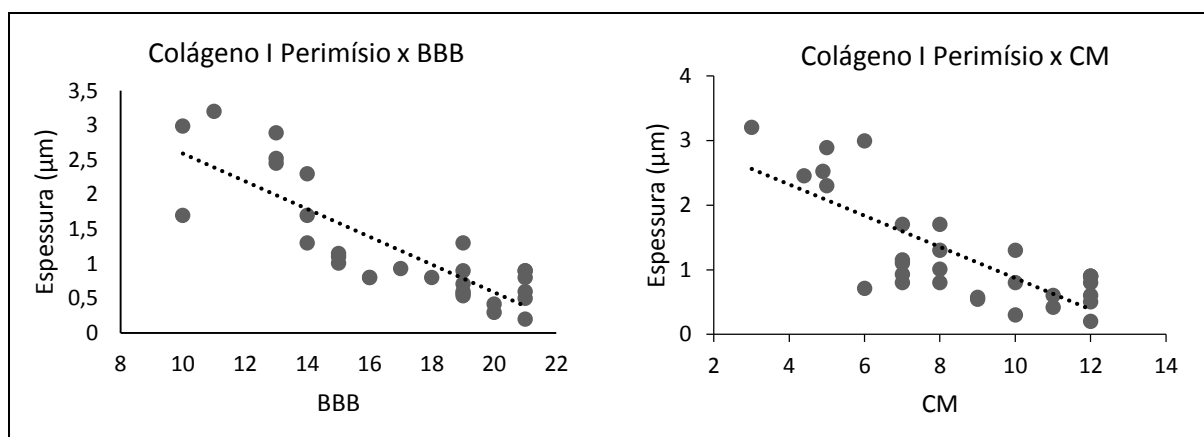


Figura 14: Diagrama de dispersão entre espessura de colágeno tipo I do perímio e escore BBB ($\rho=-0,97$) e espessura de colágeno tipo I do perímio e escore CM ($\rho=-1,00$) em ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento ($p<0,05$). Coeficiente de correlação de Spearman.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou um sistema de compressão medular baseado nos estudos de Torres et al. (2010). Segundo o autor, esta forma de lesão experimental simula um trauma medular, por provocar compressão mecânica sem ruptura direta de fibras neurais, resultando em paraplegia grave, bilateral e simétrica quando utilizado um peso compressivo de, aproximadamente, 70g. Na presente pesquisa, apenas o grupo SHAN não foi submetido ao procedimento de compressão medular, resultando em altos escores de avaliação comportamental já nas primeiras avaliações. Segundo Shah e Tisherman (2014) traumas na coluna vertebral, sem afecção da medula espinhal não tendem a evoluir para déficit de marcha. No presente trabalho, o grupo SHAN apresentou os mais altos valores da análise

BBB, indicando boa deambulação, corroborando os autores supracitados. A diferença significativa entre este grupo e os demais nos tempos iniciais pré-tratamento (1°, 3°, 7° e 14° DPO) da avaliação BBB comprova a efetividade do procedimento de lesão experimental.

Os traumas da coluna vertebral tendem a repercutir com LM, iniciando-se com o processo inflamatório local com objetivo de cicatrizar ou regenerar o tecido afetado e repercute com sequelas neuromusculares como a plegia ou paresia dos membros. A espasticidade esta relacionadas diretamente à LM, resultando em contraturas neuromiogênica bem como a hiperreflexia muscular e aumento da tensão passiva do músculo, o que influencia na independência funcional e na marcha do indivíduo (ALENAZI et al., 2013). Porém, segundo Shah e Tisherman (2014) traumas na coluna vertebral, sem afecção da medula espinhal não tendem a evoluir para déficit de marcha. Os animais do grupo CTR do presente estudo não atingiram valores de normalidade em nenhuma das avaliações comportamentais, uma vez que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento. Já o grupo SHAN apresentou os mais altos valores da análise BBB, indicando boa deambulação, corroborando os autores supracitados.

No presente estudo os tratamentos foram iniciados após duas semanas da lesão com objetivo de induzir a sequela espástica muscular, baseado no estudo de Murray et al. (2010) o qual relata haver alteração nos motoneurônios, após compressão medular de ratos, por excitabilidade das vias reflexas espinhais com períodos prolongados de despolarização causando espasticidade, após duas semanas da lesão.

Segundo Sherwood et al. (2000), a precocidade no início do tratamento de pacientes com LM é fundamental para minimizar os efeitos deletérios da sequela neuromotora. Todos os grupos do presente trabalho apresentaram melhoras nos escores a partir do início dos tratamentos. Porém, apenas o grupo FTAz apresentou escore classificado como normal em todos os animais avaliados nos testes de SD, PP e PT.

O grupo Az e o grupo FTAz atingiram os melhores resultados do BBB ao final do tratamento (45° DPO), seguindo apenas o grupo SHAN, indicando uma redução da incapacidade para a marcha ao final do tratamento. Esta análise corrobora achados de Cândido (2010) e Cândido e Xavier-Filho (2012) sobre os efeitos do óleo essencial da Az em tratamento por 30 dias, à medida que a efetividade do tratamento é favorecida pela sua manutenção.

Ao comparar os valores entre o grupo SHAN e o grupo Az observa-se diferenças estatística ($p < 0,05$) ao final da avaliação. Assim, apesar da evidente evolução da avaliação BBB dos ratos tratados com o bioproduto à base do OEAz, os animais deste grupo continuaram apresentando sequelas neurológicas que alteram negativamente a mobilidade e deambulação. Segundo Shrier (2004) a ausência de ativação muscular reduz a tensão ativa do músculo, tornando-o menos funcional.

No presente estudo apenas o grupo FTAz apresentou valores diferentes estatisticamente do grupo CTR, sem diferença para o grupo SHAN, indicando características semelhante a animais sem LM. Estudos como o de Cândido e Xavier-Filho (2012) utilizando a associação do bioproduto à base do OEAz e cinesioterapia apresentou significativa melhora funcional em crianças com paralisia cerebral, corroborando o presente estudo. Segundo Santos et al. (2011) as propriedades inerentes ao OEAz de modulação do influxo de cálcio para o sarcoplasma promove maior relaxamento da musculatura espástica. Segundo Scalzo (2010) a redução da espasticidade favorece o aumento da flexibilidade muscular, minimizando o risco de contraturas neuromiogênicas e, conseqüentemente, possibilitando ganho funcional da marcha.

Smith et al. (2009) relata que, além da hiperatividade dos canais de cálcio do tipo L, a regulação inadequada nestes canais em músculos espásticos leva ao aumento desse de forma crônica no retículo sarcoplasmático. Do ponto de vista fisiológico Gordon et al. (2000) e Cheng; Lederer (2008) relatam que o excesso de cálcio causa lesões extensas e alterações nas propriedades contráteis dos músculos, além de aumentar a tensão passiva e reforçar as ligações cruzadas. Sendo o colágeno dependente diretamente das ligações cruzadas para a flexibilidade muscular, irá refletir, segundo Hadlich et al. (2008) e Franken (2010), em um músculo rígido.

É possível que alterações morfológicas do colágeno, tanto no perimísio como no endomísio, altere a mecânicas muscular, podendo contribuir diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento de contraturas, desempenhando assim um papel importante em problemas de mobilidade de pacientes espásticos (DIETZ; SINKJAER, 2007). O colágeno apresenta uma importante influência na elasticidade muscular passiva e na transmissão de força entre músculo e tendão (LIEBER; FRIDÉN, 2002). Segundo Booth et al. (2001), entende-se que a quantidade e qualidade de colágeno muscular pode influenciar na capacidade contrátil e elástica do músculo. Músculos com redução do seu trofismo, assim como os espásticos, apresentam uma significativa redução no quantitativo de colágeno tipo III, em estudos experimentais (URSO, 2006).

O espessamento do colágeno tipo I do perimísio apresentou uma forte e inversa relação com os testes comportamentais BBB e CM indicando menor funcionalidade nos animais que apresentaram aumento da espessura deste colágeno. Estudos de Booth et al. (2001) realizados com 26 crianças com diagnóstico clínico de paralisia cerebral com sequela muscular espástica corroboram estes achados. Realizou-se a avaliação da hidroxiprolina, aminoácido exclusivo do colágeno, identificando correlação direta entre o acúmulo e espessamento de colágeno e o grau de espasticidade muscular. Os autores sugerem ainda que, um tratamento que previna ou minimize o espessamento do colágeno pode ser benéfico em indivíduos espásticos. No presente estudo, os três tratamentos propostos apresentaram

redução do espessamento das fibras de colágeno quando comparados ao grupo CTR, atingindo valores semelhantes estatisticamente ao grupo SHAN, sem lesão neural.

Fríden e Lieber (2003), realizaram biopsia muscular em indivíduos saudáveis e com paralisia cerebral espástica para quantificação do colágeno tipo I através de estudo imunohistoquímico, encontrando valores semelhantes ao estudo anterior: maior concentração de colágeno presente nos músculos espásticos. A análise imunohistoquímica para outras proteínas musculares não apresentaram alteração. Estes achados corroboram a presente pesquisa na qual observou-se presença classificada como intensa do colágeno tipo I no grupo CTR. A baixa concentração deste tipo de colágeno nos grupos FTAz e Az podem indicar efetividade do tratamento proposto. Já o grupo FT apresentou valores classificados como frequentes de colágeno tipo I.

Battistuzzo et al. (2012) em sua revisão sistemática, identificou resultados positivos da cinesioterapia em trabalhos onde os exercícios foram iniciados no prazo de 16 dias após lesão medular, assim como na presente pesquisa. Porém, segundo Araújo et al. (2012) a influência da cinesioterapia na condição estrutural do músculo rígido depende de um programa de longa duração e alta frequência, com resultados após quatro semanas de trabalho. Iamamura et al. (1999), apresentam achados semelhantes, com exercícios mioarticulares não apresentando alterações significativas no colágeno em até quatro semanas. No presente estudo utilizou-se o tratamento de cinesioterapia por 30 dias, o que pode justificar os achados do presente estudo.

Outra questão é a flexibilidade muscular fornecida pelo colágeno a qual relaciona-se de forma inversamente proporcional às ligações cruzadas. Quanto maior a síntese de colágeno, menor o número de ligações cruzadas, e, como resultado, maior a flexibilidade (FRANKEM, 2010). A presença frequente de colágeno tipo III no grupo SHAN, bem como nos grupos FT e FTAz, sugere menor número ligações cruzadas, com diminuição da tensão passiva, facilitando a mobilidade do músculo espástico. O grupo Az apresentou intensa presença do colágeno tipo III, superior aos demais grupos. Este fato justifica-se pela ausência da ativação muscular quando comparado aos grupos FT e FTAz, não gerando tensão ativa, tornando-o mais flexível (SHRIER, 2004). Porém, ainda segundo Shrier (2004) o aumento da flexibilidade pela redução da espasticidade não irá repercutir em aumento da funcionalidade do indivíduo, caso não haja tensão ativa para contração muscular.

De acordo com Oliveira (2009), uma contração muscular normal acontece com a elevação dos níveis de Ca^{++} , induzindo a ligação entre tropomiosina e actina, gerando tensão e/ou encurtamento do sarcômero. A manutenção de elevados níveis de Ca^{++} no citosol favorece a perpetuação do aumento do tônus muscular patológico, estando relacionada com a espasticidade. Segundo Li et al. (2003) para o relaxamento muscular e redução da espasticidade é preciso a regularização da concentração de Ca^{++} . Os estudos de Santos et al

(2011) sobre a modulação da concentração do cálcio após uso do óleo essencial corroboram com nossa pesquisa, comprovando que o bioproduto à base do OEAz regulam os canais de cálcio, podendo assim influenciar na formação do colágeno.

7 CONCLUSÃO

Verificou-se que a utilização do bioproduto à base do OEAz associado aos exercícios de cinesioterapia mostrou-se eficaz para modificar as alterações na espessura e organização do colágeno causadas pela espasticidade após LM em modelo murino através das alterações na espessura do colágeno. Após 30 dias de tratamento, os animais assim tratados apresentaram características funcionais e histomorfológicas semelhantes aos animais sem lesão medular.

Os animais que receberam os tratamentos separadamente obtiveram melhoras funcionais quando comparados ao grupo CTR, porém, mesmo ao final do período de tratamento, ambos os grupos ainda apresentavam diferença do grupo sem lesão medular.

8 REFERÊNCIAS

- ADAMS R.P. *Identification of Essential Oils Components by Gas chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, 2007.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17(1): 114-140.
- ALBUQUERQUE, E.S.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). *Acta Botanica*. 2004; 18(1): 109-121.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L.C.; BARRETO, S.A.L.; PIRES, A.J.; REIS, P.F.; LIMA, O.S.; RIBEIRO, G.M.A.; et al. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int. J. Morphol.* 2009; 27(4): 1105-1110.
- ALENAZI, B.; QURESHI, A.R.M.; ALFARAIDY, S.; ALMULLA, A. The importance of full spinal cord screening and assessment of trauma patients involved in motor vehicle accidents – A case report. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2013; 8(3): p. 183-186.
- ANDRADE M.J.; GONÇALVES S. Lesão Medular Traumática. Recuperação Neurológica e Funcional. *Acta Med Port*. 2007; 20(5): 401-406.
- ARAUJO, V. et al. Efeito dos exercícios de fortalecimento e alongamento sobre a rigidez tecidual passiva. *Fisioterapia e Movimento*, 2012; 25(4): 869-882.
- BAHR R.; FOSSAN B.; LOKEN S.; ENGBRETSSEN L. Surgical treatment compared with eccentric training for patellar tendinopathy (jumper's knee). *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2006; 88(1): 8-16.

BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12(1): 1–21.

BATTISTUZZO, C.R.; CALLISTER, R.J.; CALLISTER, R.; GALEA, M.P. A systematic review of exercise training to promote locomotor recovery in animal models of spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 2012; 29(1): 1600–1613.

BENNETT, D.J.; SANELLI, L.; COOKE, C.L.; HARVEY, P.J.; GORASSINI, M.A. Spastic longlasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J. Neurophysiol*. 2004; 91(1): 2247-2258.

BEZERRA, M.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D. N.; FONTELES, M.C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. *Phytotherapy Research*. 2000; 14(7): 549-51.

BOOTH, C.M.; CORTINA-BORJA, M.J.F.; THEOLOGIS, T.N. Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2001, 43(1): 314–320.

BRASHEAR, A.; LAMBETH, K. Spasticity. *Curr Treat Options Neurol*. 2009; 11(3):153-161.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular**. MS. 2012; 68 p.

CAL, K. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their ex vivo skin absorption and elimination kinetics. *Journal Of Dermatological Science*. 2006a, 41(2): 137-42.

CAL, K. How does the type of vehicle influence the in vitro skin absorption and elimination kinetics of terpenes?. *Archives of Dermatological Research*. 2006b, 297(7): 311-315.

CAMPOS, M.F., et al. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2008; 35(2): 88-93.

CÂNDIDO, E.A.F.; XAVIER-FILHO, L.; MAIA, M.O.N.; FIGUEIREDO, A.E.L.; QUERINO, L.S.; CÂNDIDO, J.F. Efeito a longo prazo do medicamento a base do óleo essencial da *Alpinia speciosa* SCHUM, ZINGIBERACEAE (Ziglague) em síndrome piramidal. *BrAzilian Journal of Physical Therapy*. 2010; 14(2): 104-104.

CÂNDIDO, E.A.F.; XAVIER-FILHO, L. Viabilidade do uso do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* Zingiberaceae, na otimização do tratamento fisioterapêutico em paralisia cerebral espástica. *Arq. Bras. Neurocir*. 2012; 31(3): 110-115.

COSTA, M.C.C.D; CORREA, A.J.C; LIMA, C.E. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burt & R. M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. *Rev. bras. plantas med*. 2010; 12(1): 113-119.

DASARI, V.R.; VEERAVALLI, K.K.; DINH, D.H. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. *World J Stem Cells*. 2014; 6(2): 120-133.

DEFINOS, H.L.A. Trauma raquimedular. *Medicina*. 1999; 32(1): 388-400.

DIETZ, V.; SINKJAER, T. Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics. *Lancet Neurol.* 2007; 6(1): 725–733.

ELZAAWELY, A.A. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm. *Food Chemistry.* 2007; 104(4): 1648-53.

FERREIRA, L.L.; MARINO, L.H.C.; CAVENAGHI S. Atuação fisioterapêutica na lesão medular em unidade de terapia intensiva: atualização de literatura. *Rev Neurocienc.* 2012; 20(4): 612-617.

FRÍDEN, J.; LIEBER, R. L. Spastic muscle cells are shorter and Stiffer than normal cells. *Muscle & Nerve.* 2003; 26(1): 157-164.

GEROMINI, K.V.N.; RORATTO, F.B.; FERREIRA, F.G.; POLIDO, P.P.; SOUZA, S.G.H.; VALLE, J.S.; et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* 2012; 15(2): 127-131.

GRACIES, J.M. Pathophysiology of spastic paresis, I: paresis and soft tissue changes. *Muscle Nerve.* 2005; 31(1): 535–51.

GRACIES, J.M.; ELOVIC, E.; ZOROWITZ, R.; MCGUIRE, J., SIMPSON, D. Traditional pharmacologic treatments for spasticity. Part I: local treatments. In: Brashear A, Mayer NH, (eds). *Etiology, evaluation, management and the role of botulium toxin*. New York: We Move; 2008, 57-78.

GRAHAM, H.K., et al. Recommendations for the use of botulinum toxin type A in the management of cerebral palsy. *Gait Posture.* 2000; 11(1): 67-79.

HEINEN F. et al. European consensus table 2006 on botulinum toxin for children with cerebral palsy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2006; 10(6): 215-225.

IAMAMURA, S.; IAMAMURA, M.; HIROSE-PASTOR, E. Efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o colágeno do músculo esquelético humano. *Revista Brasileira de Reumatologia.* 1999; 39(1): 35-40.

JÄGER, W.; et al. Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1,8-cineol in humans during inhalation. *Chemical Senses.* 1996; 21(4): 477-480.

JUERGENS, U.R.; et al. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine.* 2003; 97(3): 250-256.

JUERGENS, U.R.; et al. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 2004; 17(5): 281–287.

KHALIL Z.; PEARCE A.L.; SATKUNANATHAN N.; STORER E.; FINLAY-JONES J.J.; HART, P.H. regulation of wheal and flare by tea tree oil: Complementary human and rodent studies. *Journal of Investigative Dermatology,* 2004; 123(4): 683-690.

KLIMKIEWICZ, P.; KUBSIK, A.; JANKOWSKA, A.; WOLDAŃSKA-OKOŃSKA, M. The effect of standard kinesiotherapy combined with proprioceptive neuromuscular facilitation method and standard kinesiotherapy only on the functional state and muscle tone in patients after ischaemic stroke. *Polski merkurusz lekarski*. 2013; 35(1): 268-271.

KRIECK, C.; FINATTO, T.; MÜLLER, T.S.; GUERRA, M.P.; ORTH, A.I. Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2008. 10(2): 103-110.

LAHLOU, S.; GALINDO, C.A.B; LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C.; DUARTE G.P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, Terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. *Planta Medica*. 2002; 68(12): 1097-102.

LEDERMAN E. *Fundamentals of manual therapy: physiology, neurology and psychology*. London: Churchill Livingstone, 1997.

LEMAN, S.; BERNET, F.; SEQUEIRA, H. Autonomic dysreflexia increases plasma adrenaline level in the chronic spinal cord-injured rat. *Neuroscience letters*. 2000; 286(3): 159-162.

LI, Y.; GORASSINI, M.A.; BENNETT, D.J. Role of persistent sodium and calcium currents in motoneuron firing and spasticity in chronic spinal rats. *J Neurophysiol*. 2003; 91(1): 767–783.

LI, Y.; BENNETT, D.J. Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J Neurophysiol*. 2003; 90(1): 857–869.

LIEBER R.L.; RUNESSON E.; EINARSSON F.; FRIDÉN J. Inferior mechanical properties of spastic muscle bundles due to hypertrophic but compromised extracellular matrix material. *Muscle Nerve*. 2003; 28(4): 464-71.

LIEBER R.L.; FRIDÉN J. Spasticity causes a fundamental rearrangement of muscle–joint interaction. *Muscle Nerve*. 2002; 25(1): 265–270.

LIMA, E. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plantes against dermatophytes, *Mycoses*. 2003; 36(11): 333-336.

MASUDA T.; MIZUGUCHI S.; TOMOCHIKA, T.; IRITANI, K.; TAKEDA, Y. Isolation and structure determination of new antioxidative ferulic acid glucoside esters from the rhizome of *Alpinia speciosa*, a Zingiberaceae plant used in okinawan food culture. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2000; 48(5): 1479-84.

MENDONÇA, V.L.M.; OLIVEIRA, C.L.A.; CRAVEIRO, A.A.; RAO, V.S.; FONTELES, M.C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1991; 86(2): 93-7.

MEYER F; VIALLES LR; VIALLES EM; BLEGGI-TORRES LF; RASERAS E; LEONELS I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2003; 18(3): 112-119.

MURAKAMI, M.; MATSUURA, T.; SATOU, S.; HAYASHI, S.; KOIKE, K. Effects of the essential oil from leaves of *Alpinia zerumbet* on behavioral alterations in mice. *Natural Product Communication*. 2009; 4(1): 129–132.

MURRAY K.C., NAKAE A., STEPHENS M.J., RANK M., D'AMICO J., HARVEY P.J., et al. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT. *Nat. Med.* 2010; 16(1): 694–700.

NASCIMENTO, N. Terpinen-4-ol: mechanisms of relaxation on rabbit duodenum. *Journal of Pharmacology*, Fortaleza, v. 57, n. 4, p. 467-74, Abr. 2005.

OLSSON, M.C., et al. Fibre type-specific increase in passive muscle tension in spinal cord-injured subjects with spasticity. *The Journal of Physiology*. 2006; 577(1): 339-352.

OSBORN, J.W.; TAYLOR, R.F.; SCHRAMM, L.P. Chronic cervical spinal cord injury and autonomic hyperreflexia in rats. *Am J Physiol*. 1990; 258(1), 169-174.

PATEL, D.R.; SOYODE O. Pharmacologic interventions for reducing spasticity in cerebral palsy. *Indian J Pediatr*. 2005; 72(10): 869-872.

ROY, R.; EDGERTON, V. Neurobiological perspective of spasticity as occurs after a spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 2012; 235(1): 116–122.

SANTOS, B.A., ROMAN-CAMPOS, D., CARVALHO, M.S, MIRANDA, F.M.F., CARNEIRO, D.C., CÂNDIDO, E.A.F., et al. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca²⁺ current blockade. *Phytomedicine*. 2011; 18(1): 539-543.

SAPRA B; JAIN S; TIWARY AK. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. 2008; 10(1): 120-132.

SCALZO, P.L.; SOUZA, E.S.; MOREIRA, A.G.O.; VIEIRA, D.A.F. Qualidade de vida em pacientes com Acidente Vascular Cerebral: clínica de fisioterapia. *Revista Neurociência*. 2010; 18(2): 139-144.

SCHMIDT B.J.; PAPIN J.A.; MUSANTE C.J. Mechanistic systems modeling to guide drug discovery and development. *Drug Discovery Today*. 2013; 18(4): 116-127.

SEDÝ, J.; URDZÍKOVA, L.; JENDELOVÁ, P.; SYKOVÁ E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32(3): 550- 580.

SHAH, R.R.; TISHERMAN, S.A. Spinal cord injury. In: Falter, F., Screaton, N.J. *Imaging the ICU Patient*. 1 ed. Londres: Springer London; 2014. p. 377-380.

SHERWOOD, A.M.; GRAVES, D.E.; PRIEBE, M.M. Altered motor control and spasticity after spinal cord injury: Subjective and objective assessment. *Journal of Rehabilitation Research and Development*. 2000; 37(1): 41-52.

SHRIER I. Does stretching improve performance? A systematic and critical review of the literature. *Clin J Sport Med*. 2004; 14(1): 267-73.

SILVA, G.A.; SCHOELLER, S.D.; GELBCKE, F.L.; CARVALHO, Z.M.F.C.; SILVA, E.M.J.P. Epidemiologia da paraplegia traumática em um Centro de Reabilitação em Fortaleza, Ceará, Brasil, *EFDeportes*, 2012; 17(171): 15-21.

SMITH, L.R.; et al. Novel transcriptional profile in wrist muscles from cerebral palsy patients. *BMC Medical Genomics*. 2009; 2(44): 10-30.

SORIANO J.G.; CUERDA L.C.L.; HELLIN E.M.; GUTIERREZ R.O.; TAYLOR J.S. Valoración y cuantificación de la espasticidad: revisión de los métodos clínicos, biomecánicos y neurofisiológicos. *Rev Neurol*. 2012; 55(4): 217-226.

SULLIVAN, S.B.; SCHMITZ, T.J.; *Fisioterapia: avaliação e tratamento*. 4. ed. São Paulo: Manole, 2004.

TAWATA, S.; TAIRA, S.; KOBAMOTO, N.; ISHIHARA, M.; TOYAMA, S. Syntheses and biological activities of dihydro-5,6-dehydrokawain derivatives. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1996; 60(10): 1643-5.

TILTON A. Management of spasticity in children with cerebral palsy. *Semin Pediatr Neurol*. 2009; 16(2): 82-89.

TORRES, B.B.J., et al. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotático modificado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2010; 62(1): 92-99.

URSO, M.L.; SCRIMGEOUR, A.G.; CHEN, Y.; THOMPSON, P.D.; CLARKSON, P.M. Analysis of human skeletal muscle after 48 h immobilization reveals alterations in mRNA and protein for extracellular matrix components. *J Appl Physiol*. 2006; 101(1): 1136–1148.

VIEIRA, S.C.H.; SOLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZARATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. *Rev. bras. Farmacogn*. 2010; 20(1): 28-34.

VON EULER, M.; AKESSON, E.; SAMUELSSON, E.B. Motor Performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol*. 1996; 137(2): 242-254.

WALSH M.T. Upper limb neural tension testing and mobilization. Fact, fiction, and a practical approach. *Journal of hand therapy*. 2010; 18(2): 241-58.

WAGNER, H.; WISENAUER, M. *Fitoterapia: Fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas*. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks. 2006.

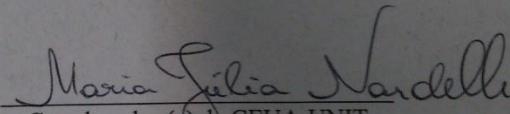
WARD A.B. Spasticity treatment with botulinum toxins. *J Neural Transm*. 2008; 115(4): 607-616.



UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto, “Efeitos do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* zingiberácea no colágeno dos tecidos musculares espásticos de ratos pós-lesão induzida”, processo nº 030513, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pelo pesquisador **Edna Aragão Farias Cândido**, onde recebeu o parecer de **Aprovado**, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 27 de junho de 2013.


Coordenador (a) da CEUA-UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT

Prof.^a Maria Júlia Wardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

Tempo: _____

Movimento dos membros				Posição do tronco		Caminhando																
E:2	E:3	E:7				Colocação da pata 8-10					F: 8 e 14	O: 9 F:10, 11, 12 C:13	O:11 F:12 C:13	15-O 16,17-F 18-C	R/L/RE no contato inicial-14 R/L/RE no balanço -16 Paralelas no contato inicial -15,16 Paralelas no balanço-17				Instabilidade de tronco 20 Sim	Rabo 19 Abaixado		
Quadril	Jornho	Tornozelo		Lado	Contralado	Apóio	Abdome	Sluave	Com suporte	Sem suporte												
0	0	0	0	0	E	D		E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	
							Apoiado															
L	L	L	L	L			Paralelo							A		A	A	A	O		A	
E	E	E	E	E	E		Altro							O		O	O	O	F		O	

A= Ausente, O = Ocasionalmente, E = Extenso, F= Frequentemente, C = Consistente, MA= membros anteriores, MP=membros posteriores.

0-Nenhum movimento 1-Discreto 1 ou 2 articulações 2-Extenso 1 articulação/ Discreto 1 articulação 3-Extenso 2 articulações 4-Discreto 3 articulações 5-Discreto 2 articulações/ Extenso 1 articulação 6-Extenso 2 articulações/ Discreto 1 articulação 7-Extenso 3 articulações/ Sem colocação (apoio) plantar	8-Nenhum apoio plantar/ frequente apoio do dorso da pata 9-Ocasional apoio plantar 10-Frequente apoio plantar	11-Frequente apoio plantar/ Ocasional Coordenação entre MA e MP 12-Frequente apoio plantar/ Frequente Coordenação entre MA e MP 13-Constante apoio e Coordenação entre MA e MP	14-Rotação interna ou externa da pata no contato inicial/ Ocasional apoio dorsal da pata 15-Pata paralela no contato inicial/ Ocasional movimentos dos dedos apenas na fase de balanço 16-Pata paralela ao corpo no contato inicial/ Qualquer rotação e Frequente movimento dos dedos no balanço 17-Freq. Mov. dos dedos no balanço/ Patas paralelas no contato inicial e levantar-se 18-Constante mov. dos dedos/ Patas paralelas no contato inicial e rodadas no levantar-se 19-Patas paralelas no contato inicial e ao levantar-se/
--	--	---	--

APÊNDICE I

Artigo submetido à revista InterScience Place (ISSN: 1679-9844 – Qualis B1 Interdisciplinar) no dia 05 de janeiro de 2015.

EFEITOS DA CINESIOTERAPIA ASSOCIADA AO BIOPRODUTO À BASE DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* SOBRE O COLÁGENO DOS TECIDOS MUSCULARES ESPÁSTICOS DE RATOS PÓS-LESÃO MEDULAR.

EFFECTS OF KINESIOTHERAPY ASSOCIATED TO BIOPRODUCT BASED THE ESSENTIAL OIL OF *Alpinia zerumbet* ON COLLAGEN TISSUE MUSCLE SPASTIC OF RATS AFTER SPINAL CORD INJURY

Felipe Lima de Cerqueira¹, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior², Cláudia Alcaraz Zini³, Elina Bastos Caramao⁴, Edna Aragão Farias Cândido⁵

¹ Universidade Tiradentes, Programa de Mestrado em Saúde e Ambiente (PSA), Aracaju, SE, Brasil, e-mail: fisio@felipecerqueira.com.br

² Universidade Tiradentes, Programa de Mestrado e Doutorado em Saúde e Ambiente (PSA), Aracaju, SE, Brasil, e-mail: ricardo_luiz@unit.br

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Departamento de Química Inorgânica, Porto Alegre, RS, Brasil, e-mail: cazini@iq.ufrgs.br

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Departamento de Química Inorgânica, Porto Alegre, RS, Brasil, e-mail: elina@ufrgs.br

⁵ Universidade Tiradentes, Programa de Mestrado e Doutorado em Saúde e Ambiente (PSA), Aracaju, SE, Brasil, e-mail: edna_aragao1@globo.com

RESUMO

A lesão medular (LM) é uma condição neurológica que envolve a interrupção parcial ou total do trânsito neuronal pela medula espinhal e pode resultar em deficiência física grave. A espasticidade é o transtorno mais incapacitante para o indivíduo pois limita a mobilidade e a funcionalidade do paciente. Sabe-se que alterações no colágeno muscular estão presentes em músculos espásticos. O bioproduto derivado da *Alpinia zerumbet* tem ação antiespasmódica e reguladora da concentração de cálcio no músculo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da cinesioterapia associada ao bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre o colágeno dos tecidos musculares espásticos em modelo murino. Trata-se de uma pesquisa experimental realizada com 30 ratos (Wistar) divididos em

cinco grupos de seis animais: grupo Az (tratado com bioproduto), FT (tratado com fisioterapia), FTAz (tratado com a associação bioproduto e fisioterapia), CTR (controle 1 - sem realização de tratamento) e SHAN (controle 2 - sem lesão medular). Procedeu-se laminectomia a nível da nona vertebra torácica seguida de lesão medular compressiva (exceto no grupo SHAN). Foram realizadas análises comportamentais identificando ausência de disfunções neurológicas do grupo SHAN, bem como total recuperação após 21 e 28 dias dos grupo Az e FTAz respectivamente. O grupo FTAz foi o único a não apresentar diferença estatística quando comparado ao grupo SHAN. A análise histomorfológica indicou predominância do colágeno tipo III caracterizada como frequente e tipo I como razoável no grupo FTAz. Assim, pode-se concluir que a utilização de exercícios fisioterápicos associado ao bioproduto à base do OEAz mostrou-se eficaz para reverter as alterações na espessura e organização do colágeno causadas pela espasticidade após LM em modelo murinho.

Palavra-chave: *Alpinia*; fisioterapia; espasticidade muscular; lesão medular; colágeno.

ABSTRACT

The spinal cord injury (LM) is a neurological condition that involves partial or total neuronal traffic interruption by the spinal cord and can result in several physical disability. Spasticity is the most disabling disorder for an individual because limits patient mobility and functionality. It is known that changes in muscle collagen are present in spastic muscles. Bioproduct based the essential oil of *Alpinia zerumbet* with antispasmodic and regulatory action of the muscle calcium concentration. Thus, this study objective was to evaluate the bioproduct based the essential oil of *Alpinia zerumbet* application effect in rats spastic muscle tissues. This is an experimental research conducted with 30 Wistar rats divided into five groups of six animals: Az group, FT, FTAz, CTR (without treatment) and SHAN (without spinal cord injury). It was proceeded laminectomy at the ninth thoracic vertebra level followed by compressive spinal cord injury (except with SHAN group). Behavioral analyzes were performed to identify neurological dysfunction absence at the SHAN group, as well as full recovery after 21 and 28 days of Az and FTAz groups, respectively. The FTAz group was the only one that presents no statistical difference when compared to the SHAN group. The histomorphological analysis indicated frequent predominance of type III collagen and reasonable of type I at FTAz group. Thus, it can be concluded that the bioproduct based the essential oil of *Alpinia zerumbet* use associated with physical therapy was.

Keywords: *Alpinia*; Spasticity; Physical Therapy, Spinal Cord Injury; Collagen.

INTRODUÇÃO

A medula espinhal é a estrutura neural responsável por conduzir impulsos elétricos, aferentes e eferentes, entre o encéfalo e o corpo. Localizada dentro do canal medular, a

medula espinhal é comumente lesionada em casos de traumas diretos ou indiretos na coluna vertebral, e pode resultar em déficit motor e sensitivo, repercutindo com limitação funcional para o indivíduo (SILVA et al., 2012).

A lesão medular (LM) acomete primordialmente adultos jovens, entre 15 e 30 anos, cursando com paraplegias em 70% dos casos e tetraplegia em 30%. Estas sequelas apresentam-se parciais ou completas, limitando a independência funcional destes indivíduos. Quanto às causas da LM, as lesões traumáticas, como os acidentes automobilísticos, representam 42% do total de traumas medulares. (MEYER et al, 2003; SULLIVAN; SCHMITZ, 2004).

Para um paciente com LM, a espasticidade representa o maior fator limitante de sua mobilidade e, conseqüentemente, de sua independência funcional. Caracterizada pelo aumento dos reflexos miotendinosos que resultam em incremento do tônus muscular patológico, a espasticidade restringe a mobilidade articular, e tende a evoluir para contraturas neuromiogênicas comprometendo a funcionalidade do indivíduo (BRASIL, 2012; SORIANO et al., 2012).

Uma das características do músculo espástico é o incremento da quantidade de colágeno intramuscular, em especial do tipo I, bem como aumento da espessura do colágeno presente, o que reduz a extensibilidade muscular, além de contribuir para o aumento da contratura e rigidez passiva (SMITH, 2011). Segundo Booth et al. (2001), o colágeno, por ser uma proteína estrutural responsável pela manutenção da fisiologia muscular tem importante influencia na condição funcional do músculo espástico.

O tratamento da LM é composto de exercícios de fisioterapia que inibem a ativação do fuso neuromuscular minimizando os efeitos da espasticidade. Técnicas fisioterapêuticas auxiliam ainda no fortalecimento muscular, otimizando o controle de tronco e, conseqüentemente a capacidade de manutenção postural. Além dos exercícios, alguns medicamentos auxiliam a regulação do tônus muscular, minimizando a característica espástica da lesão, como os benzodiazepínicos, cloridrato de imipramina, gabapentina e toxina botulínica tipo A. Estes tratamentos beneficiam não apenas a saúde física do indivíduo, como também sua condição psicossocial, uma vez que a limitação da mobilidade é um fator significativo de exclusão social (SILVA et al., 2012).

A fitoterapia pode representar uma alternativa eficiente no tratamento de diversas disfunções, como a espasticidade. Conhecida como colônia, devido ao seu odor característico, a *Alpinia zerumbet* (Az) é uma planta herbácea, da família Zingiberaceae, comumente encontrada no nordeste brasileiro, popularmente utilizada como diurético, sedativo e hipotensor. Dentre os efeitos terapêuticos dos derivados da Az já pesquisados, pode-se destacar a sua ação sobre a modulação da concentração do cálcio, bem como a atividade antiespasmódica e de relaxamento do tônus basal. Essa característica induz ao

relaxamento muscular com normalização do tônus, podendo representar benefício para diversas condições clínicas, a exemplo da espasticidade (BEZERRA et al., 2000).

A busca de um tratamento que auxilie na recuperação funcional de músculos espásticos de indivíduos com LM. Por acometer principalmente indivíduos em idade produtiva e impor sequelas motoras restritivas e incapacitantes, o traumatismo medular deve ser alvo de atenção das políticas públicas de saúde. Sendo assim, a utilização de um bioproduto com potencial para melhorar a funcionalidade destes indivíduos pode gerar impactos econômicos e sociais (SCHMIDT et al., 2013). Desta forma, a proposta desta pesquisa foi avaliar os efeitos da cinesioterapia associada a um bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre o colágeno de tecidos musculares espásticos em modelo murino.

METODOLOGIA

Desenho da pesquisa

Estudo experimental, pré-clínico e controlado.

Animais

Utilizou-se 30 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultos, de ambos os sexos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Os animais permaneceram no referido biotério, em gaiolas de polipropileno padrão, agrupadas em número de 3, em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Os animais foram avaliados em seu comportamento funcional e neurológico e seu material biológico (gastrocnêmio direito) submetido a análise histomorfológicas. Ao final de cada experimento os animais foram anestesiados, sacrificados e, posteriormente, incinerados no Biotério da Universidade Tiradentes. O estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 030513 da referida universidade.

Bioproduto

O bioproduto à base do OEAz foi produzido, a partir da coleta de folhas verdes, transportadas em carro climatizado, tendo sido realizada a extração do seu óleo essencial por arraste a vapor e utilizado óleo vegetal como veículo.

Amostra do medicamento utilizado no presente estudo foi submetida à análise cromatográfica no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com objetivo de identificar a composição do produto.

O bioproduto foi analisado por cromatografia gasosa (GC) com detector de espectrometria de massa (Shimadzu, Japão, QP 2010-plus) operando com energia de ionização de 70 eV e com uma massa contida no intervalo de 45-450 Da. Na identificação da

constituição química foi empregada coluna capilar DB5 (Agilent Technologies, EUA) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de filme de espessuras de fase estacionária. Foi empregado um fluxo de gás de 1 mL/min de hélio (ultrapura, Linde Gases, Brasil). A temperatura do detector e do injetor foi mantida a 250°C, iniciando o aquecimento a 40°C, com acréscimo de 3°C/min, até atingir 220°C.

A composição relativa dos óleos foi obtida partindo do princípio de que a soma de todas as áreas de composto foi de 100%, e fatores de resposta não foram tomados em consideração devido à falta de padrão comercial disponível. Os compostos foram identificados por tentativa, comparando seus índices de retenção, obtidos experimentalmente pela temperatura linear programada (LPTRI) com os relatados na literatura. Os espectros de massa dos compostos de óleos essenciais também foram comparados com os relatados no NIST (versão 107) e Wiley (versão 229) da biblioteca espectros de massa, e utilizando a descrição de espectros de massa de Adams (2007) como uma ajuda adicional na identificação.

Procedimento cirúrgico

O modelo de lesão medular baseou-se no experimento de Torres et al. (2010) e Osborn et al. (1990), seguindo as normas de pré e pós-operatório do *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS). Os animais foram pesados e, em seguida, anestesiados com Cloridrato de Ketamina a 10% (95mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal.

Após anestesia os animais foram posicionados em decúbito externo com o dorso exposto (Figura 1A) para realização de tricotomia e antissepsia da região torácica, com solução de polivinil pirrolidona iodo (Figura 1B). Em seguida, realizou-se incisão de, aproximadamente, 5cm de pele e tecido subcutâneo sob a linha média da região torácica, com afastamento subperiosteal da musculatura perivertebral, objetivando exposição da coluna vertebral (Figura 1C).

Para exposição do canal medular, foi feita a localização das vértebras T9 e T10 através da palpação da última costela e realizada a laminectomia destes seguimentos. Neste momento reproduziu-se o trauma mecânico utilizando um aparelho estereotáxico modificado, confeccionado pelos pesquisadores composto de uma haste fina de ponta romba (1mm²) com peso acoplado de 70g por 5 minutos (Figura 1D).

Posteriormente procedeu-se a sutura da camada muscular e pele com fio 4.0 de poliamida monofilamento não absorvível sendo aplicado antibioticoterapia profilática com Pentabiol a 0,1ml/100g, por via intraperitoneal. Ao final da cirurgia os animais foram acomodados em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, em ambiente climatizado.

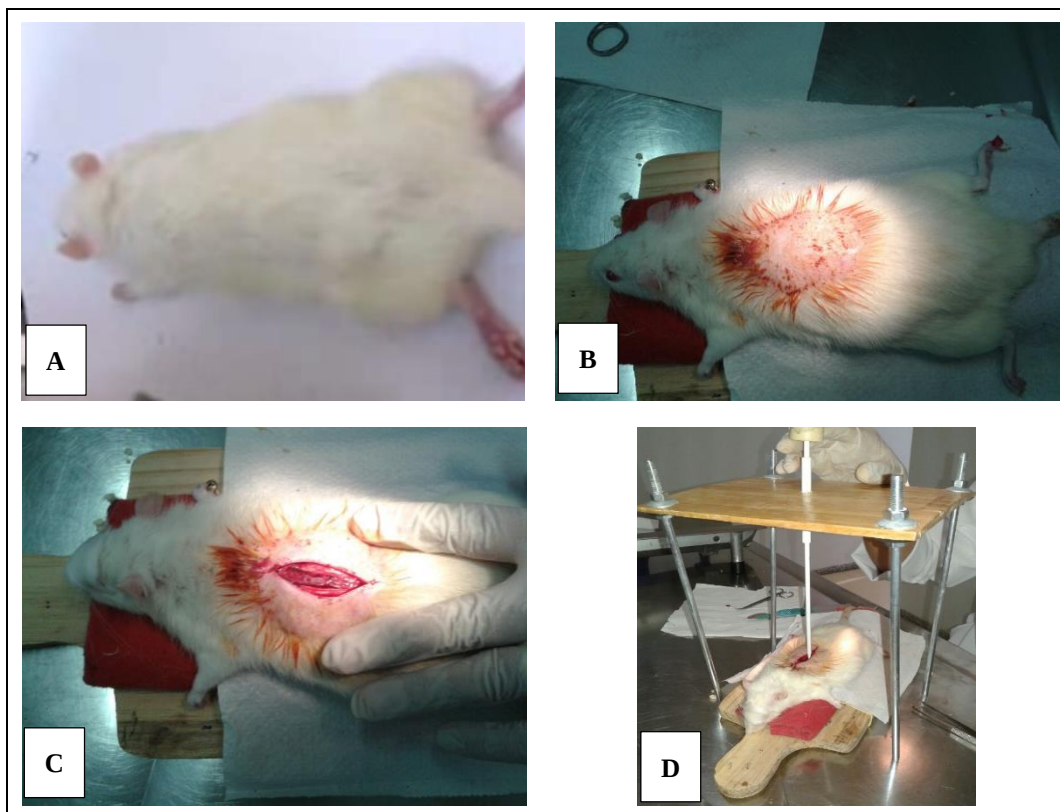


Figura 1: A) Posicionamento do animal; B) Tricotomia e antisepsia da região; C) Exposição da coluna vertebral; E) Utilização do aparelho estereotáxico modificado para lesão medular.

Grupos experimentais e doses

Os 30 animais foram separados aleatoriamente e igualmente em cinco grupos da seguinte forma:

- Grupo Az: aplicação do bioproduto à base do OEAz sob dose 0,05ml/2Kg dividido igualmente em ambas as patas traseiras, aplicado por via dérmica nas panturrilhas;
- Grupo FT: realização de exercícios fisioterápicos passivos em ambas as patas traseiras, realizando tríple flexão com 2 séries de 10 repetições;
- Grupo FTAz: aplicação do bioproduto à base do OEAz sob dose 0,05ml/2Kg dividido igualmente em ambas as patas traseiras, aplicado por via dérmica nas panturrilhas, seguido de realização de exercícios fisioterapêuticos passivos em ambas as patas traseiras, realizando tríple flexão com 2 séries de 10 repetições;
- Grupo CTR: sem nenhum tipo de tratamento;
- Grupo SHAN: sem tratamento, tendo sido realizada a laminectomia, porém sem lesão medular.

Os tratamentos foram realizados nas patas traseiras devido ao nível de compressão medular (T9/T10) gerar sequela motora nesta região.

Protocolo de tratamento

Os animais dos grupos Az, FT e FTAz iniciaram tratamento diário no 15º dia pós-operatório (DPO), quando a espasticidade tornava-se presente (BENNETT et al., 2004), sendo mantidos até o 45º DPO, totalizando 30 dias de tratamento. Realizou-se a massagem abdominal com o objetivo de esvaziar a bexiga e a defecção, quando necessário.

Protocolo de avaliação

A avaliação abrangeu características comportamentais e histológicas dos animais. Os testes funcionais para avaliação comportamental e neurológica foram realizados em 8 momentos: 4 antes do início dos tratamentos (no 01º, 03º, 07º, 14º DPO) e 4 após este momento (no 21º, 28º, 35º e 45º DPO). Assim possibilitou-se observar o comprometimento funcional e comportamental na lesão aguda, subaguda e crônica, além do quadro correspondente à hipotonia e hipertonia, semelhantes aos indivíduos acometidos com LM. As avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador, amenizando possíveis variações nos resultados obtidos.

Utilizou-se 5 testes para compor a avaliação comportamental e neurológica: o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), o teste de sensibilidade dolorosa (SD), a capacidade motora (CM), o posicionamento proprioceptivo (PP) e tátil (PT).

Para realização do BBB, foi utilizada uma escala de avaliação locomotora padronizada (ANEXO III). Os itens avaliados foram: os movimentos das patas, sua coordenação, firmeza e comportamento do tronco. Seus subitens versam sobre o movimento do membro posterior, posição do tronco, abdome, posição da pata, caminhada, posição predominante da pata, instabilidade do corpo e rabo. O BBB é composto por 22 escores, variando de 0 (ausência total de movimentos) a 21 (movimento normal). Para este teste cada rato foi colocado em um campo aberto, cercado por acrílico permitindo total visualização, sendo avaliado por dois minutos (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995; SEDÝ, 2008).

Os demais testes foram descritos por Von Euler et al. (1996). Na avaliação da CM observou-se a atividade espontânea do animal em campo aberto e sem obstáculo, na dimensão de 1m² por 4 minutos. Caso fosse capaz de deambular com um déficit discreto, o animal era colocado em percurso de madeira com larguras reduzidas progressivamente, começando com 7,7cm e terminando com 1,7cm e progressão de 1cm entre elas, totalizando assim sete barras (Figura 2). Esse percurso foi posicionado a uma altura de 60 cm, com 1 metro de extensão. O escore varia de 0 a 12 seguindo a tabela 1.

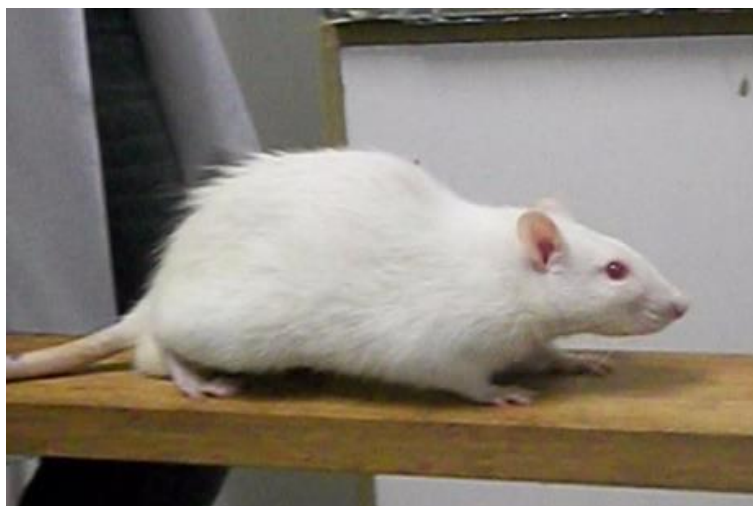


Figura 2: Teste de capacidade motora sobre barra estreita.

Tabela 1. Escore de capacidade motora.

CAPACIDADE MOTORA (CM)	
0	Ausência de movimento nos membros pélvicos, sem apoio de peso
1	Movimento sutil, desconexo dos membros pélvicos, sem apoio de peso
2	Movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso
3	Apoio de peso nos membros pélvicos, deambulação com déficit acentuado
4	Deambulação com déficit moderado
5	Deambulação com déficit discreto e não anda na barra de 7,7cm
6	Deambulação normal ou com déficit discreto e anda na barra de 7,7cm
7	Consegue deambular na barra de 6,7cm
8	Consegue deambular na barra de 5,7cm
9	Consegue deambular na barra de 4,7cm
10	Consegue deambular na barra de 3,7cm
11	Consegue deambular na barra de 2,7cm
12	Consegue deambular na barra de 1,7cm

No teste SD fez-se uma pressão na prega interdigital das patas traseiras, utilizando uma pinça hemostática de *Halsted* fechada na primeira cremalheira. A resposta varia de acordo com a tentativa ou realização de morder, vocalizar e/ou a velocidade de retirada da pata (Figura 3).



Figura 3. Teste de sensibilidade dolorosa.

A avaliação PP foi utilizada para verificar a agilidade e precisão que o animal tem para retornar a posição normal, quando sua pata é colocada em flexão, proporcionando o contato do dorso da referida pata com o chão (Figura 4A). Enquanto no PT, o dorso da pata foi colocado em contato com a borda lateral da mesa, sendo avaliada a precisão e agilidade com que o animal irá colocar sua pata na superfície da referida mesa (Figura 4B).

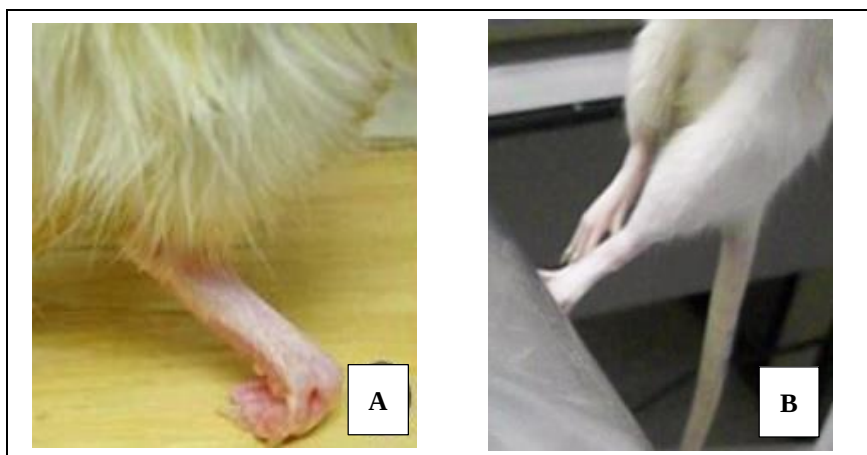


Figura 4: A) Teste de posicionamento proprioceptivo; B) Teste de posicionamento tátil.

Os testes SD, PP e PT apresentam escore classificado como 0 (ausência de reação), 1 (reação diminuída) e 2 (reação normal). Todos os testes realizados foram filmados e avaliados posteriormente para evitar erros nas determinações de seus escores. Após analisados, os valores foram organizados em um banco de dados para melhor visualização dos resultados, levando em consideração a pata com maior acometimento.

Análise histomorfológicas

Após o 45° DPO os ratos foram eutanasiados e os gastrocnêmios retirados e embebidos em formol a 10%. O material biológico passou por um processo de desidratação e clareamento em álcool e xilol por um período total de 6 horas, sendo três imersões de uma hora em cada produto. Posteriormente fez-se a inclusão em parafina para confecção de 5 secções histológicas seriadas de 5µm de espessura, separadas entre si por uma distância de 10µm. Para análise histomorfológica do tecido muscular analisou-se as secções histológicas coradas em Picrossírius, segundo Albuquerque Júnior et al. (2009).

Para análise do padrão de neoformação do colágeno, utilizou-se um polarizador para luz transmitida (45 MM U-POT, Olympus) acoplado ao microscópio trinocular CX31 (Olympus), com sistema de captura de imagens C-70070 WIDE ZOOM (Olympus). Em cada lâmina foram fotomicrografados cinco campos histológicos (ampliação de 100x), sendo as imagens digitalizadas por meio de software de captura Olympus 2000® e projetadas em

monitor Samsung® de 14'. Para análise descritiva do padrão de formação do colágeno foi analisada as seguintes variáveis: birrefringência (esverdeada ou amarelo-esverdeada para colágeno tipo III imaturo, e alaranjada ou avermelhada para colágeno tipo I maduro); espessura (delgada/delicada ou espessa/grosseira); e disposição (ondulada ou estirada).

A leitura do colágeno foi qualitativa tendo como observação a prevalência, em porcentagem, do colágeno tipo I e III encontrado em cada lâmina e apresentados baseando-se nos escores: 0 à 24% foi descrito como escasso; 25 à 49% razoável; 50 à 74% frequente; e 75 à 100% intenso.

Fez-se ainda a mensuração da espessura do colágeno muscular, tipo I e tipo III, localizado no perímio e no endomíio, nas imagens capturadas através do software AxioVision 105 color, expressas em micrômetro.

Análise estatística

A tabulação de dados e tabelas foi confeccionada pelo programa Microsoft Excel 2010. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prim 6.01. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade das variáveis estudadas. Para as análises de comparações múltiplas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn. Para verificar possíveis correlações entre as variáveis comportamentais e histomorfológicas utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Em todas as análises será utilizado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A análise cromatográfica do bioproduto à base do OEAz identificou 57 compostos totalizando 97,58% do total dos componentes, com retenção maior em nove componentes somando 78,43% do total da área cromatográfica. Os monoterpenos oxigenados são predominantes na composição do óleo essencial, e representam 45% do total do composto (Figura 5A e 5B). Na análise cromatográfica destaca-se o terpeno-4-ol (23,23%), presente em todos os órgãos da planta e o 1,8 cineol (21,77%), presente nas folhas, como os principais compostos identificados, além do γ -terpeno (11,63%) e p-cineol (5,85%). Os resultados da análise cromatográfica foram semelhantes aos encontrados por Craveiro et al. (1980) e Santos et al. (2011).

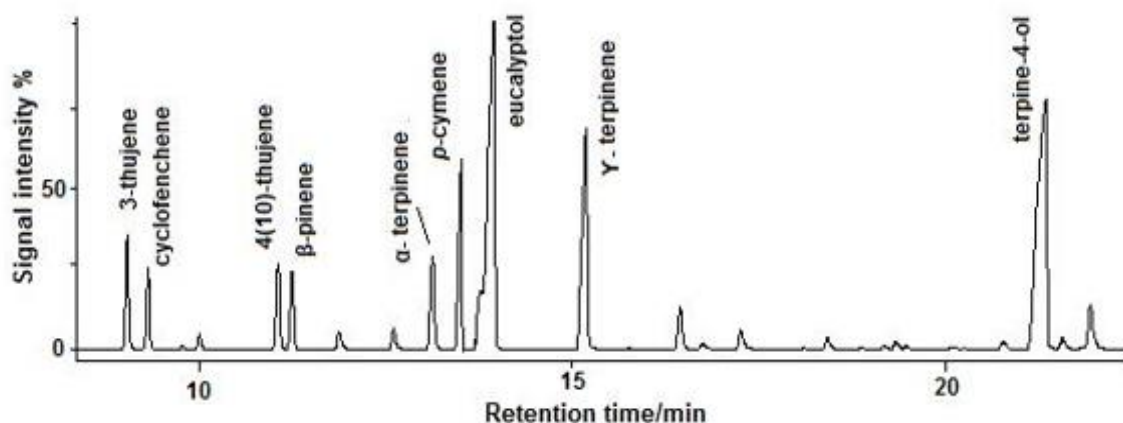


Figura 5: Componentes em destaque na análise cromatográfica do bioproduto à base do OEAz. Espectrometria de massa, coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), fluxo de gás hélio (1 mL/min), temperatura do detector e do injetor foi mantida a 250°C.

Na avaliação BBB pré-tratamento, todos os grupos submetidos à LM apresentaram escores semelhantes entre si. No 14° DPO o grupo SHAN apresentou os maiores escores quando comparado aos demais grupos, observando diferença significativa ($p < 0,001$), indicando a efetividade do procedimento de lesão experimental (Figura 6).

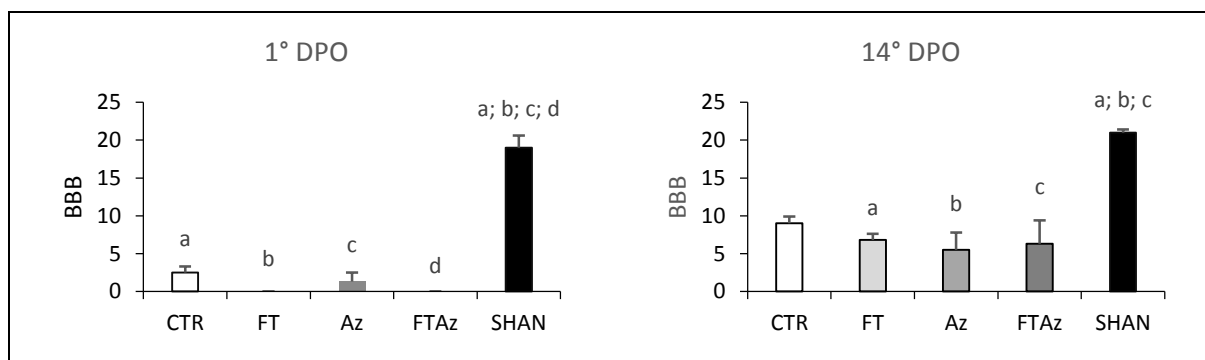


Figura 6: Comparativo do escore Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) intergrupos em músculos espásticos de ratos tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz em diferentes tempos pré tratamento. As barras representam a média, com seu respectivo desvio padrão, dos escores da avaliação BBB de cada animal em seu grupo. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

Nos tempos seguintes ao início do tratamento, os grupos SHAN e CTR apresentaram diferença significativa entre si em todos os tempos avaliados. Houve aumento gradual nos escores BBB dos grupos submetidos a algum tratamento a partir do 21° DPO. Nesta avaliação, apenas os grupos CTR e FT apresentaram diferença significativa em relação ao grupo SHAN ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente), assim como na avaliação do 28° DPO. Na avaliação de 35 dias após a lesão medular o grupo Az também apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo SHAN ($p < 0,05$). Ao final do tratamento, na avaliação

do 45° DPO, apenas o grupo FTAz apresentou valores diferentes estatisticamente ao grupo CTR ($p<0,05$) e semelhantes ao grupo SHAN (Figura 7).

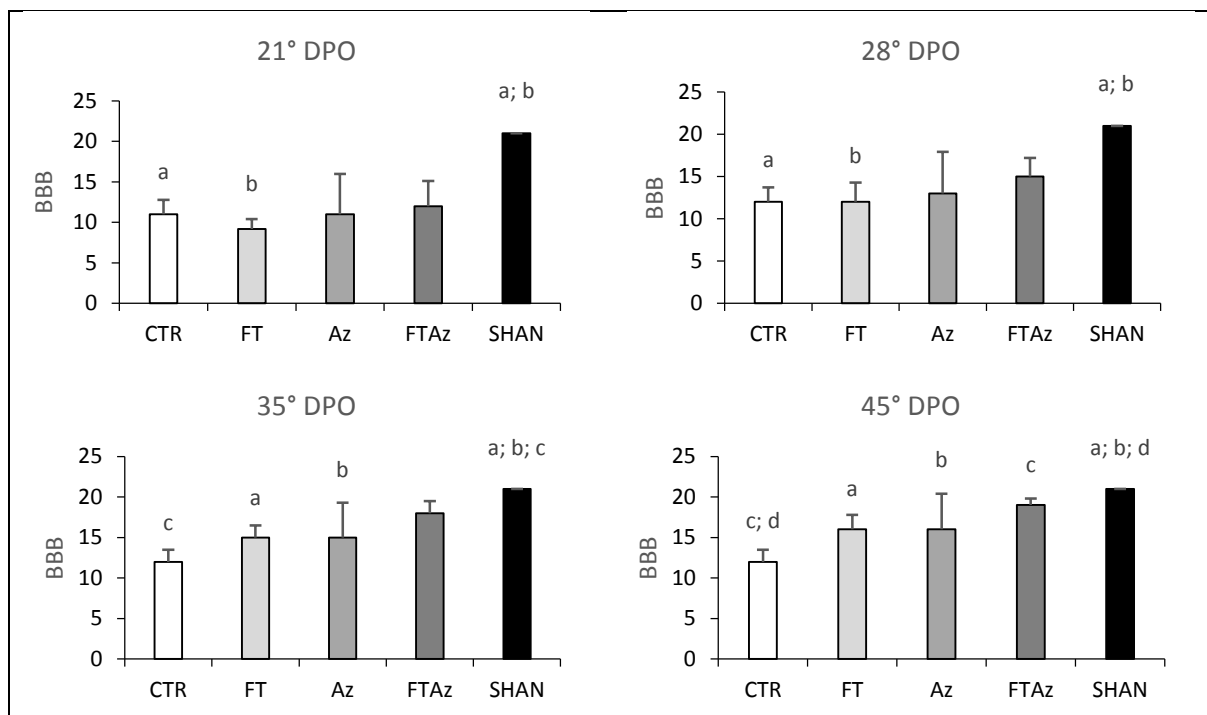


Figura 7: Comparativo do escore Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) intergrupos em músculos espásticos de ratos tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz em diferentes tempos pós início do tratamento. As barras representam a média, com seu respectivo desvio padrão, dos escores da avaliação BBB de cada animal em seu grupo. ($p<0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

Na avaliação da Capacidade Motora, o grupo FTAz apresentou diferente significativa quando comparado aos grupos CTR e FT em todos os tempos após o início do tratamento. A partir de 28 dia após à LM o grupo Az também apresentou diferença significativa comparado ao grupo CTR ($p<0,05$), mantendo-se assim até o final das avaliações (Figura 8).

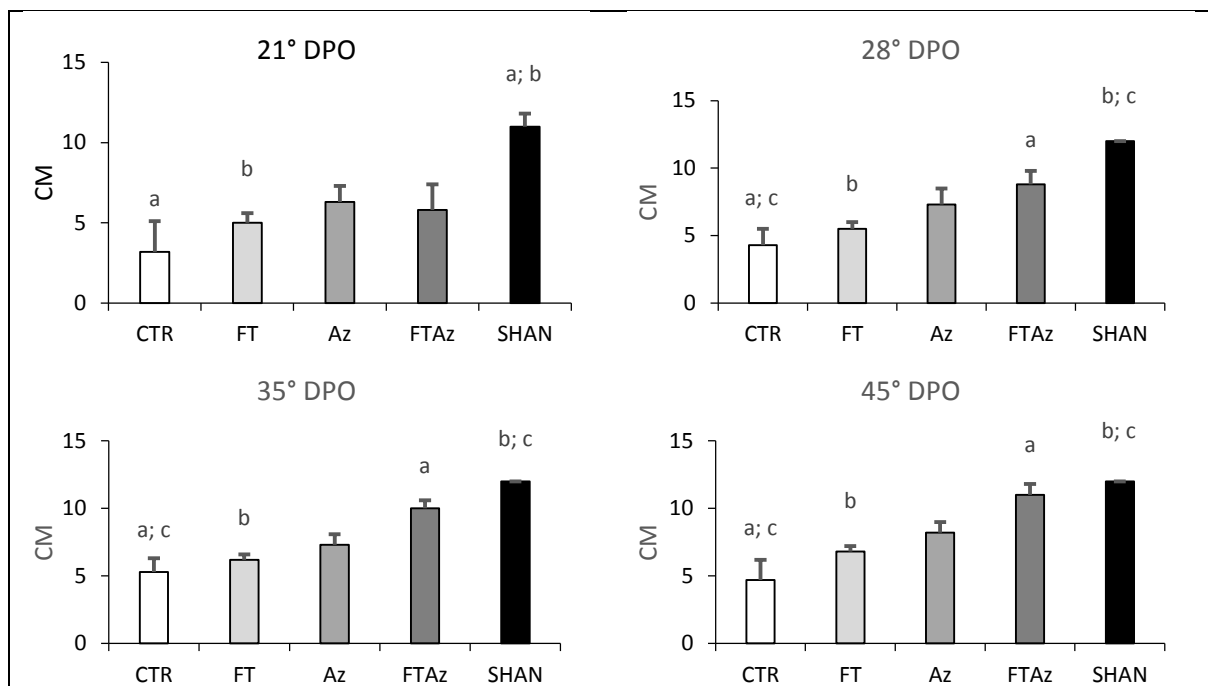


Figura 8: Comparativo do escore de Capacidade Motora (CM) intergrupos em músculos espásticos de ratos com alteração de colágeno, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz nos diferentes tempos pós início do tratamento. As barras representam a média, com seu respectivo desvio padrão, dos escores de CM de cada animal em seu grupo. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

A avaliação neurológica, composta pelos testes de sensibilidade dolorosa, posicionamento tátil e proprioceptivo apresentaram valores máximos em todos os animais do grupo SHAN, a partir do 3°DPO, apresentando diferença estatística ($p < 0,01$) para os demais grupos. Já os animais do grupo CTR não atingiram escore classificado como normal em nenhuma das avaliações. No 21° DPO os grupos Az e FTAz apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo CTR ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente) na avaliação da SD, PP e PT. Ainda nestas avaliações todos os grupos tratados apresentaram valores de normalidade no 45° DPO. Porém, apenas o grupo FTAz apresentou todos os animais com valores normais de respostas já ao final da primeira semana de tratamento, no 21° DPO (Figura 9).

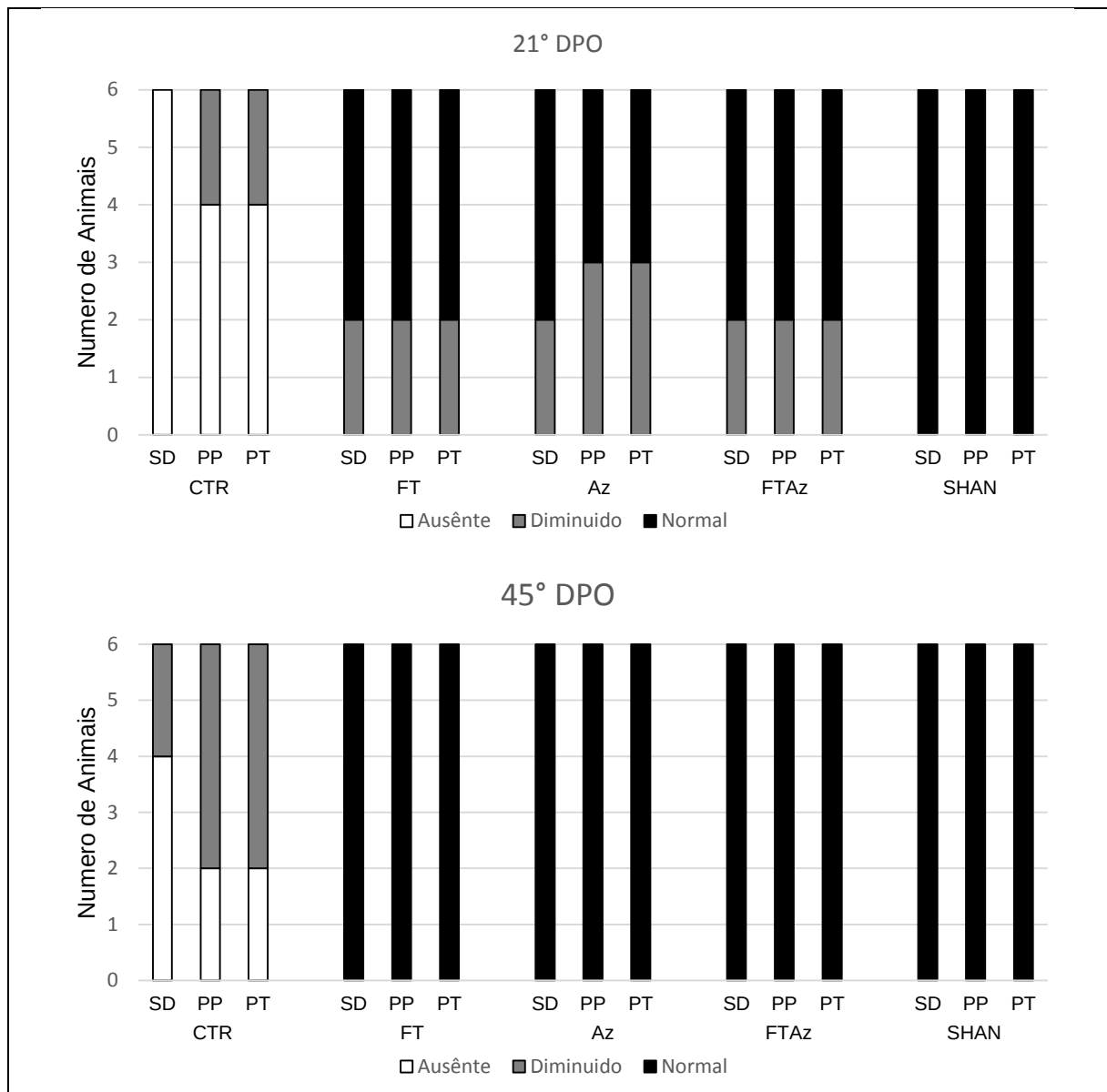


Figura 9: Comparativo do escore de Sensibilidade Dolorosa, Posicionamento Proprioceptivo e Posicionamento Tátil intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz nos tempos de 21 e 45 dias pós operatório.

Quanto a predominância do colágeno tipo I apresentou-se escasso no grupo SHAN (44%) e no grupo Az (56,25%), frequente no grupo FT (44,83%), e intenso no grupo CTR (51,79%), todos com $p < 0,001$. O Grupo FTAz obteve predominância razoável em 60% das lâminas com $p < 0,01$ (Figura 10).

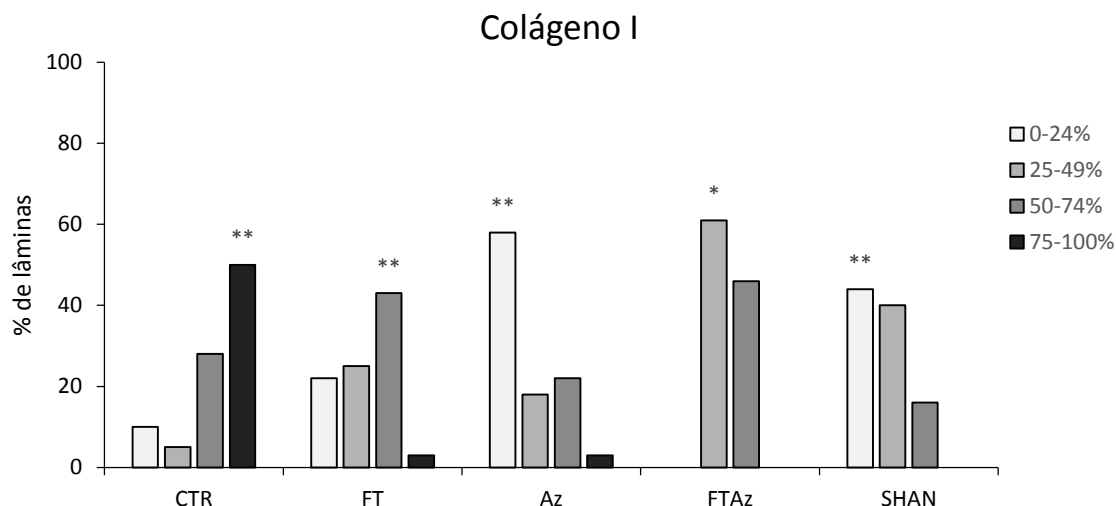


Figura 10: Predominância de colágeno tipo I intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. **Legenda:** * $p<0,01$; ** $p<0,001$. Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn.

A predominância do colágeno tipo III foi frequente nos grupos SHAN (52%), FT (68,97%) e no grupo FTAz (100%). No grupo Az classificou-se como intenso em 56,25%, enquanto no grupo CTR, apresentou-se escasso em 50%, todos com $p<0,001$ (Figura 11).

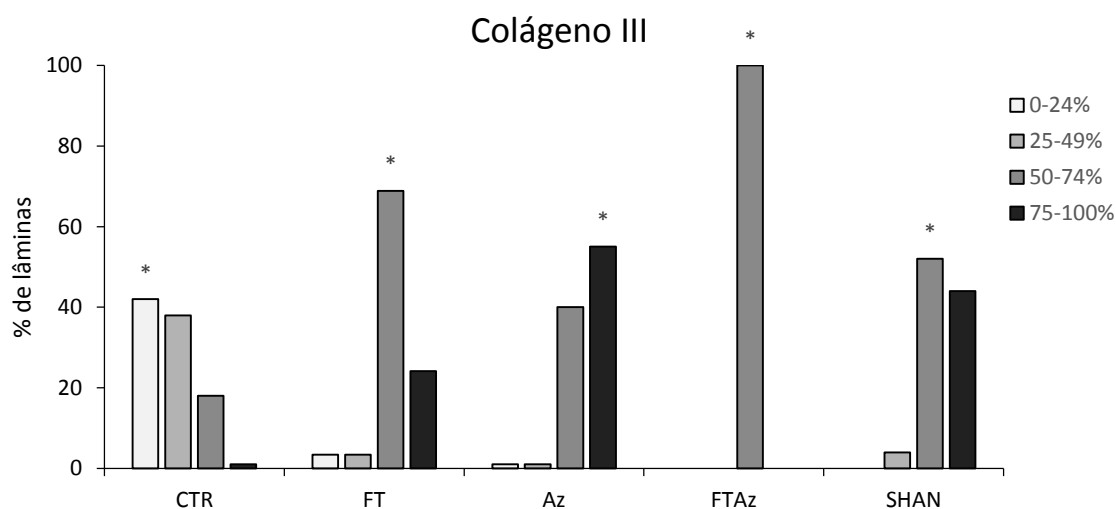


Figura 11: Predominância de colágeno tipo III intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. **Legenda:** * $p<0,001$. Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn.

Na mensuração da espessura do colágeno tipo I o grupo CTR apresentou o maior volume no endomísio quando comparado aos demais grupos, com diferença significativa ($p<0,001$). Valores semelhantes foram encontrados na mensuração do colágeno tipo I localizado no perimísio no qual o grupo CTR apresentou diferença significativa para o grupo

FT, com $p < 0,01$ e para os demais grupos, com $p < 0,001$. Os grupos SHAN, FT, FTAz e Az não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 12).

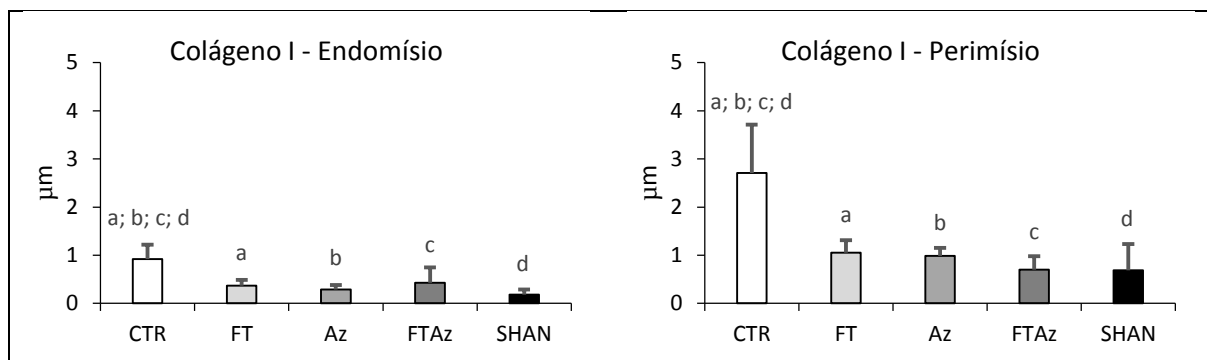


Figura 12: Espessura de colágeno tipo I localizado no endomísio ou perimísio em intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

Para o colágeno tipo III localizado no endomísio tanto o grupo CTR, FT, FTAz e Az foram significativamente diferentes do grupo SHAN. Na mensuração do colágeno tipo III localizado no perimísio, não houve diferenciação entre os três grupos tratados e o grupo SHAN. Porém, quando comparados ao grupo CTR todos apresentaram diferença significativa (Figura 13).

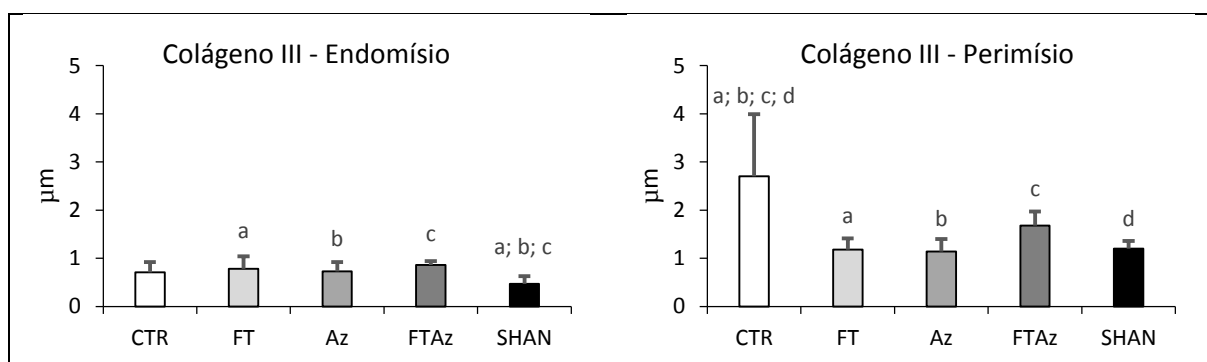


Figura 13: Espessura de colágeno tipo III localizado no endomísio ou perimísio em intergrupos em músculos espásticos de ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn).

Verificou-se a correlação entre os testes comportamentais, BBB e CM, do 45° DPO e a espessura do colágeno tipo I e tipo III localizado no endomísio e no perimísio (Tabela 2).

Tabela 2: Coeficiente de correlação entre colágeno tipo I e III localizados no perímio ou endomíio e testes comportamentais (BBB e CM) em ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento.

	BBB	CM
Colágeno I – perímio	$\rho=-0,97^*$	$\rho=-1,00^*$
Colágeno I – endomíio	$\rho=-0,66$	$\rho=-0,70$
Colágeno III – perímio	$\rho=-0,15$	$\rho=-0,20$
Colágeno III – endomíio	$\rho=-0,05$	$\rho=-0,01$

Legenda: * $p<0,05$; Coeficiente de correlação de Spearman.

Obteve-se valores significativos ($p<0,05$) com correlação forte e inversa entre colágeno tipo I do perímio e escore BBB ($\rho=-0,97$), bem como entre este mesmo colágeno e o escore de CM ($\rho=-1$; Figura 14).

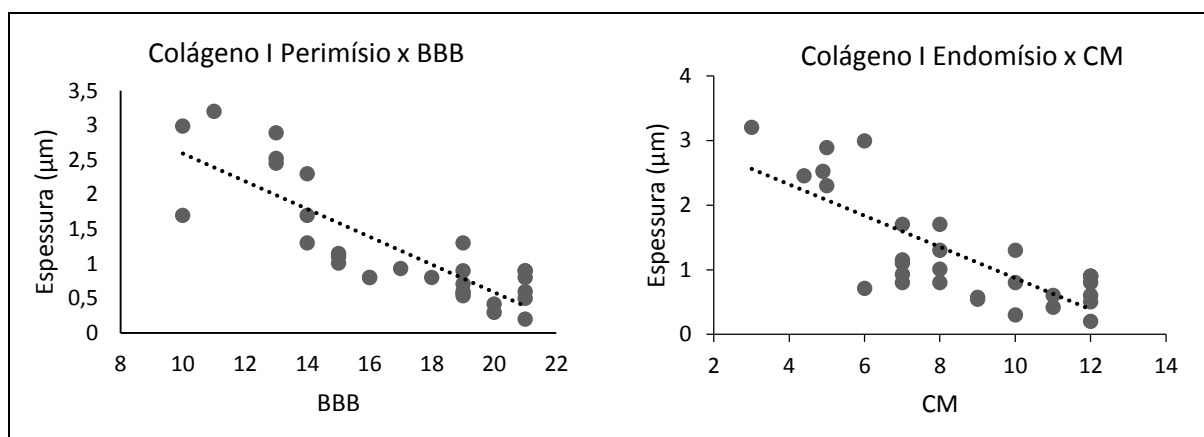


Figura 14: Diagrama de dispersão entre espessura de colágeno tipo I do perímio e escore BBB ($\rho=-0,97$) e espessura de colágeno tipo I do perímio e escore CM ($\rho=-1,00$) em ratos, tratados ou não com cinesioterapia e ou bioproduto à base do OEAz, após 45 dias de tratamento ($p<0,05$). Coeficiente de correlação de Spearman.

DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou um sistema de compressão medular baseado nos estudos de Torres et al. (2010). Segundo o autor, esta forma de lesão experimental simula um trauma medular, por provocar compressão mecânica sem ruptura direta de fibras neurais, resultando em paraplegia grave, bilateral e simétrica quando utilizado um peso compressivo de, aproximadamente, 70g. Na presente pesquisa, apenas o grupo SHAN não foi submetido ao procedimento de compressão medular, resultando em altos escores de avaliação comportamental já nas primeiras avaliações. Segundo Shah e Tisherman (2014) traumas na coluna vertebral, sem afecção da medula espinhal não tendem a evoluir para déficit de marcha. No presente trabalho, o grupo SHAN apresentou os mais altos valores da análise

BBB, indicando boa deambulação, corroborando os autores supracitados. A diferença significativa entre este grupo e os demais nos tempos iniciais pré-tratamento (1°, 3°, 7° e 14° DPO) da avaliação BBB comprova a efetividade do procedimento de lesão experimental.

Os traumas da coluna vertebral tendem a repercutir com LM, iniciando-se com o processo inflamatório local com objetivo de cicatrizar ou regenerar o tecido afetado e repercute com sequelas neuromusculares como a plegia ou paresia dos membros. A espasticidade está relacionada diretamente à LM, resultando em contraturas neuromiogênica bem como a hiperreflexia muscular e aumento da tensão passiva do músculo, o que influencia na independência funcional e na marcha do indivíduo (ALENAZI et al., 2013). Porém, segundo Shah e Tisherman (2014) traumas na coluna vertebral, sem afecção da medula espinhal não tendem a evoluir para déficit de marcha. Os animais do grupo CTR do presente estudo não atingiram valores de normalidade em nenhuma das avaliações comportamentais, uma vez que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento. Já o grupo SHAN apresentou os mais altos valores da análise BBB, indicando boa deambulação, corroborando os autores supracitados.

No presente estudo os tratamentos foram iniciados após duas semanas da lesão com objetivo de induzir a sequela espástica muscular, baseado no estudo de Murray et al. (2010) o qual relata haver alteração nos motoneurônios, após compressão medular de ratos, por excitabilidade das vias reflexas espinhais com períodos prolongados de despolarização causando espasticidade, após duas semanas da lesão.

Segundo Sherwood et al. (2000), a precocidade no início do tratamento de pacientes com LM é fundamental para minimizar os efeitos deletérios da sequela neuromotora. Todos os grupos do presente trabalho apresentaram melhoras nos escores a partir do início dos tratamentos. Porém, apenas o grupo FTAz apresentou escore classificado como normal em todos os animais avaliados nos testes de SD, PP e PT.

O grupo Az e o grupo FTAz atingiram os melhores resultados do BBB ao final do tratamento (45° DPO), seguindo apenas o grupo SHAN, indicando uma redução da incapacidade para a marcha ao final do tratamento. Esta análise corrobora achados de Cândido (2010) e Cândido e Xavier-Filho (2012) sobre os efeitos do óleo essencial da Az em tratamento por 30 dias, à medida que a efetividade do tratamento é favorecida pela sua manutenção.

Ao comparar os valores entre o grupo SHAN e o grupo Az observa-se diferenças estatística ($p < 0,05$) ao final da avaliação. Assim, apesar da evidente evolução da avaliação BBB dos ratos tratados com o bioproduto à base do OEAz, os animais deste grupo continuaram apresentando sequelas neurológicas que alteram negativamente a mobilidade e deambulação. Segundo Shrier (2004) a ausência de ativação muscular reduz a tensão ativa do músculo, tornando-o menos funcional.

No presente estudo apenas o grupo FTAz apresentou valores diferentes estatisticamente do grupo CTR, sem diferença para o grupo SHAN, indicando características semelhante a animais sem LM. Estudos como o de Cândido e Xavier-Filho (2012) utilizando a associação do bioproduto à base do OEAz e cinesioterapia apresentou significativa melhora funcional em crianças com paralisia cerebral, corroborando o presente estudo. Segundo Santos et al. (2011) as propriedades inerentes ao OEAz de modulação do influxo de cálcio para o sarcoplasma promove maior relaxamento da musculatura espástica. Segundo Scalzo (2010) a redução da espasticidade favorece o aumento da flexibilidade muscular, minimizando o risco de contraturas neuromiogênicas e, conseqüentemente, possibilitando ganho funcional da marcha.

Smith et al. (2009) relata que, além da hiperatividade dos canais de cálcio do tipo L, a regulação inadequada nestes canais em músculos espásticos leva ao aumento desse de forma crônica no retículo sarcoplasmático. Do ponto de vista fisiológico Gordon et al. (2000) e Cheng; Lederer (2008) relatam que o excesso de cálcio causa lesões extensas e alterações nas propriedades contráteis dos músculos, além de aumentar a tensão passiva e reforçar as ligações cruzadas. Sendo o colágeno dependente diretamente das ligações cruzadas para a flexibilidade muscular, irá refletir, segundo Hadlich et al. (2008) e Franken (2010), em um músculo rígido.

É possível que alterações morfológicas do colágeno, tanto no perimísio como no endomísio, altere a mecânicas muscular, podendo contribuir diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento de contraturas, desempenhando assim um papel importante em problemas de mobilidade de pacientes espásticos (DIETZ; SINKJAER, 2007). O colágeno apresenta uma importante influência na elasticidade muscular passiva e na transmissão de força entre músculo e tendão (LIEBER; FRIDÉN, 2002). Segundo Booth et al. (2001), entende-se que a quantidade e qualidade de colágeno muscular pode influenciar na capacidade contrátil e elástica do músculo. Músculos com redução do seu trofismo, assim como os espásticos, apresentam uma significativa redução no quantitativo de colágeno tipo III, em estudos experimentais (URSO, 2006).

O espessamento do colágeno tipo I do perimísio apresentou uma forte e inversa relação com os testes comportamentais BBB e CM indicando menor funcionalidade nos animais que apresentaram aumento da espessura deste colágeno. Estudos de Booth et al. (2001) realizados com 26 crianças com diagnóstico clínico de paralisia cerebral com sequela muscular espástica corroboram estes achados. Realizou-se a avaliação da hidroxiprolina, aminoácido exclusivo do colágeno, identificando correlação direta entre o acúmulo e espessamento de colágeno e o grau de espasticidade muscular. Os autores sugerem ainda que, um tratamento que previna ou minimize o espessamento do colágeno pode ser benéfico em indivíduos espásticos. No presente estudo, os três tratamentos propostos apresentaram

redução do espessamento das fibras de colágeno quando comparados ao grupo CTR, atingindo valores semelhantes estatisticamente ao grupo SHAN, sem lesão neural.

Fríden e Lieber (2003), realizaram biopsia muscular em indivíduos saudáveis e com paralisia cerebral espástica para quantificação do colágeno tipo I através de estudo imunohistoquímico, encontrando valores semelhantes ao estudo anterior: maior concentração de colágeno presente nos músculos espásticos. A análise imunohistoquímica para outras proteínas musculares não apresentaram alteração. Estes achados corroboram a presente pesquisa na qual observou-se presença classificada como intensa do colágeno tipo I no grupo CTR. A baixa concentração deste tipo de colágeno nos grupos FTAz e Az podem indicar efetividade do tratamento proposto. Já o grupo FT apresentou valores classificados como frequentes de colágeno tipo I.

Battistuzzo et al. (2012) em sua revisão sistemática, identificou resultados positivos da cinesioterapia em trabalhos onde os exercícios foram iniciados no prazo de 16 dias após lesão medular, assim como na presente pesquisa. Porém, segundo Araújo et al. (2012) a influência da cinesioterapia na condição estrutural do músculo rígido depende de um programa de longa duração e alta frequência, com resultados após quatro semanas de trabalho. Iamamura et al. (1999), apresentam achados semelhantes, com exercícios mioarticulares não apresentando alterações significativas no colágeno em até quatro semanas. No presente estudo utilizou-se o tratamento de cinesioterapia por 30 dias, o que pode justificar os achados do presente estudo.

Outra questão é a flexibilidade muscular fornecida pelo colágeno a qual relaciona-se de forma inversamente proporcional às ligações cruzadas. Quanto maior a síntese de colágeno, menor o número de ligações cruzadas, e, como resultado, maior a flexibilidade (FRANKEM, 2010). A presença frequente de colágeno tipo III no grupo SHAN, bem como nos grupos FT e FTAz, sugere menor número ligações cruzadas, com diminuição da tensão passiva, facilitando a mobilidade do músculo espástico. O grupo Az apresentou intensa presença do colágeno tipo III, superior aos demais grupos. Este fato justifica-se pela ausência da ativação muscular quando comparado aos grupos FT e FTAz, não gerando tensão ativa, tornando-o mais flexível (SHRIER, 2004). Porém, ainda segundo Shrier (2004) o aumento da flexibilidade pela redução da espasticidade não irá repercutir em aumento da funcionalidade do indivíduo, caso não haja tensão ativa para contração muscular.

De acordo com Oliveira (2009), uma contração muscular normal acontece com a elevação dos níveis de Ca^{++} , induzindo a ligação entre tropomiosina e actina, gerando tensão e/ou encurtamento do sarcômero. A manutenção de elevados níveis de Ca^{++} no citosol favorece a perpetuação do aumento do tônus muscular patológico, estando relacionada com a espasticidade. Segundo Li et al. (2003) para o relaxamento muscular e redução da espasticidade é preciso a regularização da concentração de Ca^{++} . Os estudos de Santos et al

(2011) sobre a modulação da concentração do cálcio após uso do óleo essencial corroboram com nossa pesquisa, comprovando que o bioproduto à base do OEAz regulam os canais de cálcio, podendo assim influenciar na formação do colágeno.

CONCLUSÃO

Verificou-se que a utilização do bioproduto à base do OEAz associado aos exercícios de cinesioterapia mostrou-se eficaz para reverter as alterações na espessura e organização do colágeno causadas pela espasticidade após LM em modelo murino através das alterações na espessura e organização do colágeno. Após 30 dias de tratamento, os animais assim tratados apresentaram características funcionais e histomorfológicas semelhantes aos animais sem lesão medular.

Os animais que receberam os tratamentos separadamente obtiveram melhoras funcionais quando comparados ao grupo CTR, porém, mesmo ao final do período de tratamento, ambos os grupos ainda apresentavam diferença do grupo sem lesão medular.

REFERÊNCIAS

- ADAMS R.P. *Identification of Essential Oils Components by Gas chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, 2007.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L.C.; BARRETO, S.A.L.; PIRES, A.J.; REIS, P.F.; LIMA, O.S.; RIBEIRO, G.M.A.; et al. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int. J. Morphol.* 2009; 27(4): 1105-1110.
- ALNAZI, B.; QURESHI, A.R.M.; ALFARAIDY, S.; ALMULLA, A. The importance of full spinal cord screening and assessment of trauma patients involved in motor vehicle accidents – A case report. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2013; 8(3): p. 183-186.
- ARAÚJO, V. et al. Efeito dos exercícios de fortalecimento e alongamento sobre a rigidez tecidual passiva. *Fisioterapia e Movimento*, 2012; 25(4): 869-882.
- BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12(1): 1–21.
- BATTISTUZZO, C.R.; CALLISTER, R.J.; CALLISTER, R.; GALEA, M.P. A systematic review of exercise training to promote locomotor recovery in animal models of spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 2012; 29(1): 1600–1613.
- BENNETT, D.J.; SANELLI, L.; COOKE, C.L.; HARVEY, P.J.; GORASSINI, M.A. Spastic longlasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J. Neurophysiol.* 2004; 91(1): 2247-2258.
- BEZERRA, M.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D. N.; FONTELES, M.C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. *Phytotherapy Research*. 2000; 14(7): 549-51.

BOOTH, C.M.; CORTINA-BORJA, M.J.F.; THEOLOGIS, T.N. Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2001, 43(1): 314–320.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular**. MS. 2012; 68 p.

CÂNDIDO, E.A.F.; XAVIER-FILHO, L.; MAIA, M.O.N.; FIGUEIREDO, A.E.L.; QUERINO, L.S.; CÂNDIDO, J.F. Efeito a longo prazo do medicamento a base do óleo essencial da *Alpinia speciosa* SCHUM, ZINGIBERACEAE (Zinglague) em síndrome piramidal. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2010; 14(2): 104-104.

CÂNDIDO, E.A.F.; XAVIER-FILHO, L. Viabilidade do uso do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* Zingiberaceae, na otimização do tratamento fisioterapêutico em paralisia cerebral espástica. *Arq. Bras. Neurocir*. 2012; 31(3): 110-115.

DIETZ, V.; SINKJAER, T. Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics. *Lancet Neurol*. 2007; 6(1): 725–733.

FRÍDEN, J.; LIEBER, R. L. Spastic muscle cells are shorter and Stiffer than normal cells. *Muscle & Nerve*. 2003; 26(1): 157-164.

IAMAMURA, S.; IAMAMURA, M.; HIROSE-PASTOR, E. Efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o colágeno do músculo esquelético humano. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 1999; 39(1): 35-40.

LIEBER, R.L.; RUNESSON, E.; EINARSSON, F.; FRIDÉN, J. Inferior mechanical properties of spastic muscle bundles due to hypertrophic but compromised extracellular matrix material. *Muscle Nerve*. 2003; 28(4): 464-71.

LIEBER, R.L.; FRIDÉN, J. Spasticity causes a fundamental rearrangement of muscle–joint interaction. *Muscle Nerve*. 2002; 25(1): 265–270.

MEYER, F.; VIALLES, L.R.; VIALLES, E.M.; BLEGGI-TORRES, L.F.; RASERAS, E.; LEONELS, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2003; 18(3): 112-119.

MURRAY, K.C., NAKAE, A., STEPHENS, M.J., RANK, M., D'AMICO, J., HARVEY, P.J., et al. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT. *Nat. Med*. 2010; 16(1): 694–700.

OSBORN, J.W.; TAYLOR, R.F.; SCHRAMM, L.P. Chronic cervical spinal cord injury and autonomic hyperreflexia in rats. *Am J Physiol*. 1990; 258(1), 169-174.

SANTOS, B.A., ROMAN-CAMPOS, D., CARVALHO, M.S, MIRANDA, F.M.F., CARNEIRO, D.C., CÂNDIDO, E.A.F., et al. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca²⁺ current blockade. *Phytomedicine*. 2011; 18(1): 539-543.

SCALZO, P.L.; SOUZA, E.S.; MOREIRA, A.G.O.; VIEIRA, D.A.F. Qualidade de vida em pacientes com Acidente Vascular Cerebral: clínica de fisioterapia. *Revista Neurociência*. 2010; 18(2): 139-144.

SCHMIDT, B.J.; PAPIN J.A.; MUSANTE C.J. Mechanistic systems modeling to guide drug discovery and development. *Drug Discovery Today*. 2013; 18(4): 116-127.

SEDÝ, J.; URDZÍKOVA, L.; JENDELOVÁ, P.; SYKOVÁ E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32(3): 550- 580.

SHAH, R.R.; TISHERMAN, S.A. Spinal cord injury. In: Falter, F., Screaton, N.J. *Imaging the ICU Patient*. 1 ed. Londres: Springer London; 2014. p. 377-380.

SHERWOOD, A.M.; GRAVES, D.E.; PRIEBE, M.M. Altered motor control and spasticity after spinal cord injury: Subjective and objective assessment. *Journal of Rehabilitation Research and Development*. 2000; 37(1): 41-52.

SHRIER I. Does stretching improve performance? A systematic and critical review of the literature. *Clin J Sport Med*. 2004; 14(1): 267-73.

SILVA, G.A.; SCHOELLER, S.D.; GELBCKE, F.L.; CARVALHO, Z.M.F.C.; SILVA, E.M.J.P. Epidemiologia da paraplegia traumática em um Centro de Reabilitação em Fortaleza, Ceará, Brasil, *EFDeportes*, 2012; 17(171): 15-21.

SMITH, L.R.; et al. Novel transcriptional profile in wrist muscles from cerebral palsy patients. *BMC Medical Genomics*. 2009; 2(44): 10-30.

SORIANO J.G.; CUERDA L.C.L.; HELLIN E.M.; GUTIERREZ R.O.; TAYLOR J.S. Valoración y cuantificación de la espasticidad: revisión de los métodos clínicos, biomecánicos y neurofisiológicos. *Rev Neurol*. 2012; 55(4): 217-226.

SULLIVAN, S.B.; SCHMITZ, T.J.; *Fisioterapia: avaliação e tratamento*. 4. ed. São Paulo: Manole, 2004.

TORRES, B.B.J., et al. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotático modificado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2010; 62(1): 92-99.

URSO, M.L.; SCRIMGEOUR, A.G.; CHEN, Y.; THOMPSON, P.D.; CLARKSON, P.M. Analysis of human skeletal muscle after 48 h immobilization reveals alterations in mRNA and protein for extracellular matrix components. *J Appl Physiol*. 2006; 101(1): 1136–1148.

VON EULER, M.; AKESSON, E.; SAMUELSSON, E.B. Motor Performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol*. 1996; 137(2): 242-254.

SOBRE OS AUTORES

Felipe Lima de Cerqueira – Mestrando em Saúde e Ambiente pela Universidade Tiradentes / SE. Especialista em Fisioterapia Traumato-Ortopédica pela Universidade Gama Filho – RJ, e em Fisioterapia Esportiva pela Sociedade Nacional em Fisioterapia Esportiva. Graduado em

Fisioterapia pela Universidade Tiradentes. Professor Preceptor da Universidade Tiradentes. Fisioterapeuta da Prefeitura Municipal de Aracaju e do Governo do Estado de Sergipe.

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior - Doutor em Patologia Oral pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Mestre em Patologia Oral pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte Pesquisador do Instituto de Tecnologia e Pesquisa - SE. Professor Titular de Patologia Oral e Maxilofacial do Curso de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes - SE. Bolsista de Produtividade em Pesquisa 2 – CNPq.

Cláudia Alcaraz Zini – Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, realizado em parte na University of Waterloo. Mestre em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Graduação em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professora associada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Bolsista de Produtividade em Pesquisa 1D – CNPq.

Elina Bastos Caramão - Doutora em Química (Físico-Química) pela Universidade de São Paulo. Mestre em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Graduada em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pesquisadora IC do CNPq. Professora Associada nível IV do Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Bolsista de Produtividade em Pesquisa 1B – CNPq.

Edna Aragão Farias Cândido - Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste em Biotecnologia – Renorbio. Mestrado em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Sergipe. Especialista em Neurologia pela Universidade Estadual da Paraíba. Graduada em Fisioterapia pela Universidade Estadual da Paraíba. Professora Titular I no Curso de Fisioterapia da Universidade Tiradentes/SE. Membro do Programa Strito Sensu no Mestrado e Doutorado em Saúde e Ambiente da UNTI/SE.