

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO MÚSCULO
ESPÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL PÓS-LESÃO MEDULAR
TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet*.**

JANAÍNA FARIAS CÂNDIDO

Aracaju
Fevereiro – 2015

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO MÚSCULO
ESPÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL PÓS-LESÃO MEDULAR
TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet*.**

Dissertação de Mestrado submetida à
banca examinadora para obtenção do
título de Mestre em Saúde e Ambiente,
na área de concentração Saúde e
Ambiente.

JANAÍNA FARIAS CÂNDIDO
Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior D.Sc
Edna Aragão Farias Cândido D.Sc

Aracaju
Fevereiro – 2015

-
- C217a Cândido, Janaína Farias
Análise das alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental pós-lesão medular tratadas com óleo essencial da *Apinia Zerumbet* / orientação [de] Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Profª. Draª. Edna Aragão Farias Cândido. – Aracaju: UNIT, 2015.
73 p.; il.
- Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2015.
Inclui bibliografia.
1. Alpinia. 2. Espasticidade muscular. 3. Óleos essenciais. I. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de. (orient.). II. Cândido, Edna Aragão Farias (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO MÚSCULO ESPÁSTICO
EM MODELO EXPERIMENTAL PÓS-LESÃO MEDULAR TRATADAS COM ÓLEO
ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet*.**

Janaína Farias Cândido

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 por:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior D.Sc.
Orientador

Edna Aragão Farias Cândido D.Sc.
Orientadora

Rubens Riscali Madi D.Sc.
1ª Examinador

Sheyla Alves Rodrigues D.Sc.
2º Examinadora

Margarete Zanardo Gomes, Ph.D.
1º Suplente

Aracaju
Fevereiro – 2015

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho as meus pais, por toda dedicação e empenho para minha educação.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado com discernimento em toda minha jornada acadêmica e agora como docente.

A minha família, meu pai pelo apoio, paciência e por suportar todos os meus momentos de agonia. A meu irmão Luis Henrique, pela ajuda em muitos dos momentos. Em especial, minha mãe Edna, além de ser minha genitora, participou como minha professora e orientadora em toda minha formação acadêmica, docente e agora como Mestre, o meu muito obrigada porque sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus avós Mirandolino e Dona Flora, pelas orações, conselhos, carinhos e o principal me mostrar sempre que sou capaz de tudo aquilo que almejo sempre confiando em Deus. Muito obrigada.

Ao meu orientador Ricardo, pela paciência, nos meus momentos de ausência, e orientação durante todo o mestrado.

Aos meus amigos pessoais (lembrando que são muitos), em especial Larissa, Sidney, Anne, Dainá e Vanessa, que foram peças fundamentais para que eu não desistisse e me lembraram sempre que não há conquista sem sofrimento. O meu muito obrigada.

Aos amigos do Centro de Reabilitação da UNIT, pelo apoio durante o meu último ano de mestrado e compreensão pelas minhas ausências. Em especial, Albertina e Prof^a Daniela Teles, por confiarem na minha competência como Profissional e Professora Preceptora do estágio, e apoio na concretização de uma etapa tão almejada por mim. Muito obrigada.

As alunas de iniciação científica, Giu, Lania, Rafaela, Jéssica, Helen e Gabi, pelo empenho e dedicação durante esses dois anos. Esta conquista também pertencem a vocês meninas, muito obrigada.

Aos amigos do Mestrado, onde posso chamar de família, por todos os momentos de alegria, desespero, apoio e confraternização. Em especial Felipe, pelo aprendizado como sua aluna, colega de mestrado e agora de trabalho, obrigada por todas as palavras de motivação e ajuda.

E aos meus alunos, porque sem a compreensão, empenho durante o estágio e confiança no meu trabalho como fisioterapeuta e professora nada disso seria possível. Agradeço em especial, a turma que está em 2015/1 pela honra, confiança e amizade em me nomearem Mestre Amiga da Turma.

À FAPITEC, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1.INTRODUÇÃO	16
2.OBJETIVOS	18
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Traumatismo raquimedular.....	19
3.2 Fibra muscular.....	21
3.3 Espasticidade.....	22
3.4 Tratamento	25
3.5 Fitoterapia.....	25
3.6 <i>Alpinia Zerumbet</i>	27
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Tipo de pesquisa.....	29
4.2 Material vegetal.....	29
4.3 Animais.....	30
4.4 Procedimento cirúrgico.....	30
4.5 Grupos e doses.....	31
4.6 Protocolo de tratamento.....	32
4.7 Protocolo de avaliação.....	32
4.8 Análise histológica.....	33
4.9 Análise estatística.....	33
5.REFERÊNCIAS.....	33
Análise das alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental pós-lesão medular tratadas com óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUÇÃO.....	46

MATERIAL E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS.....	54
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO 1.....	69
ANEXO 2.....	70
ANEXO 3.....	71
ANEXO 4.....	72

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Alterações reflexas em relação aos níveis de lesão no indivíduo com TRM. **20**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de compostos identificada pela Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC/MS) do óleo essencial isolado das folhas e ramos do OEAz. **51**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Organograma dos grupos experimentais, o 1º grupo laminectomia; 2º grupo lesão medular; 3º grupo OEAz 33%; 4º grupo OEAz 33% associado ao tratamento de Fisioterapia e o 5º grupo fisioterapia. **31**
- Figura 2:** Organograma dos grupos experimentais, o 1º grupo laminectomia; 2º grupo lesão medular; 3º grupo OEAz 33%; 4º grupo OEAz 33% associado ao tratamento de Fisioterapia e o 5º grupo fisioterapia. **49**
- Figura 3:** Corte transversal de miofibrilas. A – Laminectomia; B – Lesão medular; C- Fisioterapia; D – OEAz; e E – Fisioterapia + OEAz. Foram encontradas: células poligonais (estrela amarela); células hipertróficas (estrela preta) Célula atrofica (estrela verde); célula arredondada (estrela azul); núcleo periférico (seta branca); núcleo central (seta verde); macrófago (seta lilás); degeneração hidrópica (seta vermelha); degeneração vacuolar (seta preta); splitting (seta marrom); colágeno em perimísio (seta azul). **54**
55
- Figura 4:** Corte longitudinal de miofibrilas. A – Laminectomia; B – Lesão medular; C- Fisioterapia; D – OEAz; e E – Fisioterapia + OEAz. Foram encontradas: núcleo periférico (seta branca); miofibrilas alinhadas (seta amarela) colágeno entre as fibras (seta azul). **55**
- Figura 5:** Avaliação neurológica funcional de acordo com Basso, Beattie e Bresnahan (1995) de ratos Wistar, submetidos a lesão traumática da medular espinal durante 45 dias de lesão, e tratados ou não por 30 dias com Fisioterapia e/ou OEAz. $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$. **57**
- Figura 6:** Comparação do tamanho de miofibrila entre grupo tratado e não tratado em lesão medular experimental. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. Teste de kruskal-Wallis com pós-teste Dunn. **58**
- Figura 7:** Comparação do tamanho do endomísio entre grupo tratado e não tratado em lesão medular experimental. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,01$. Teste de kruskal-Wallis com pós-teste Dunn. **58**
- Figura 8:** Comparação do tamanho do perimísio entre grupo tratado e não tratado em lesão medular experimental. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,01$. Teste de kruskal-Wallis com pós-teste Dunn. **59**

LISTA DE SIGLAS

BBB	Basso, Beattie e Bresnahan.
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal.
ITP	Instituto de Tecnologia e Pesquisa.
LM	Lesão medular
TRM	Traumatismo raquimedular.
MASCIS	<i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study.</i>
PP	Posicionamento proprioceptivo.
PT	Posicionamento tátil.
SD	Sensibilidade dolorosa.
SP	Síndrome piramidal.
UNIT	Universidade Tiradentes.
GC	Cromatografia gasosa
GC/MS	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa

ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO MÚSCULO ESPÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL PÓS-LESÃO MEDULAR TRATADAS COM O ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet*.

RESUMO

O traumatismo raquimedular (TRM) é uma lesão que compromete o sistema nervoso central provocando uma redução ou perda da função motora e/ou sensitiva do indivíduo. A *Alpinia zerumbet* apresenta ação de relaxamento muscular pela modulação dos canais de cálcio. O objetivo deste estudo é analisar o efeito da aplicação tópica do óleo essencial de *A. zerumbet* (OEAz) sobre as alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental de lesão medular. Para tanto, foram utilizados 30 ratos Wistar, sendo realizada lesão medular (em T9 ou T10) utilizando estereotáxico adaptado em 24 deles e laminectomia nos seis restantes. Posteriormente, os animais foram divididos em 5 grupos (n=6): lesão medular, subdivididos em grupo sem tratamento e tratados com OEAZ (0,05ml/2Kg), fisioterapia e a combinação de ambos, além do grupo laminectomia. O período de tratamento foi de 30 dias. Foi realizada a avaliação comportamental de acordo com o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Após 30 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os músculos gastrocnêmios foram removidos e analisados em microscopia de luz. Os dados obtidos foram analisados com o teste Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn, considerando significativo $p < 0,05$. O estudo demonstrou que entre os grupos tratados apenas a terapia combinada de OEAz associado a Fisioterapia apresentou melhora significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo Lesão na avaliação do comportamento neurológico funcional. O estudo demonstrou que o tratamento separado da Fisioterapia ou OEAz não beneficiou adequadamente o desenvolvimento de atividade das miofibrilas. A Fisioterapia ainda permitiu o desenvolvimento de colágeno em perimísio, e o OEAz apesar de melhor resposta na avaliação neurológica comportamental apresentou espaço aumentado de endomísio, compatível com atrofia. Porém, a terapia combinada de OEAz associado a Fisioterapia apresentou miofibrilas, comportamento neurológico funcional e espaço de endomísio adequados, semelhantes ao grupo sadio (Laminectomia).

Palavra-chave: *Alpinia*; espasticidade muscular; óleos essenciais.

ABSTRACT

The spinal cord injury (SCI) is an injury that affects the central nervous system causing a reduction or loss of motor function and/or sensory function to the individual. The *Alpinia zerumbet* shows some action muscle relaxation by modulating calcium channels. The objective of this study is to analyze the effect of topical application of essential oil *A. zerumbet* (OEAz) on the spastic muscle histopathologic changes in an experimental model of spinal cord injury. For this purpose, 30 Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, young adults of both sexes) were used. The animals underwent standardized spinal cord injury. There were 5 groups of 6 animals each: The first group was the Laminectomy group, 2nd was the Injury group, Physiotherapy group the 3rd, 4th the OEAz group at a dose of 0.05 ml / 2 kg and 5th group was the OEAz and Physiotherapy, all of them were treated for 30 days. Performance evaluation was performed according to the protocol described by Basso, Beattie and Bresnahan (BBB). After 30 days, the animals were sacrificed in a CO₂ chamber and the gastrocnemius muscles fibers were extracted and examined. Data were analyzed with the Kruskal-Wallis test and post-test of Dunn, considering a significant result of ($p < 0.05$). The study showed that the groups treated with a combination therapy of OEAz associated with physical therapy showed significant improvement ($p < 0.01$) compared with the group of functional neurobehavioural injury. The study also showed that the separate treatment of physiotherapy and OEAz not adequately benefited from the development of the activity of myofibrils. Physiotherapy alone allowed the development of collagen on perimysium and OEAz also alone despite a better response behavior on the neurological assessment showed increased endomysial space, consistent with atrophy. However, the combination therapy of OEAz associated with physical therapy had myofibrils neurobehavioral functional and appropriate, similar to the healthy group (laminectomy)

Key word: *Alpinia*; spasticity muscle; essential oil

1. INTRODUÇÃO

O trauma raquimedular (TRM), lesão neurológica incapacitante, agrava por consequência, a sociedade e sua saúde pública. Afetando a região cervical e a transição toracolumbar, jovens e adultos entre 16 a 30 anos do sexo masculino, são considerados segmentos mais atingidos, resultando, em alguns casos, morte ou deficiência motora. No Brasil, há registros de até dez mil novos casos por ano, em consequência ao trauma causado, advindo por lesão de qualquer tipo de arma, quedas e acidentes de trânsito. Já em 2010, aproximadamente 96.000 casos de lesão medular com sequelas motoras, foram registrados (COSTA et al., 2014; FERREIRA et al., 2012; SANTIAGO et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Ao avaliar sequelas pós traumática, faz-se necessário a realização de estudos em laboratórios, conhecidos como modelos experimentais. Tais modelos são utilizados em estudos focados na lesão medular, porém, devemos considerar a divergência entre modelos em animais e humanos. Diferidos em mecanismos topograficamente, anatomicamente, e energia traumática, são considerados fontes ricas, e importantes, de informações para o esclarecimento da patologia. Nos últimos 90 anos, novos modelos experimentais implantados em animais, foram desenvolvidos a fim de encontrar um método efetivo de tratamento da lesão aguda da medula espinal no ser humano (Rodrigues et al., 2010).

Os mais variados modelos experimentais, pertencentes a lesão medular, foram criados, através de ensaios, realizados pelo aparelho Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study – MASCIS, de impacto por queda de peso computadorizados alternados, de 12.5, 25.0 e 50.0 mm de altura, desenvolvido pela Universidade de Nova Iorque (Torres et al., 2010; Osborn et al., 1990). Outro modelo desenvolvido por Rivlin e Tator, 1978, imaginaram uma compressão sustentada gerada por um clipe de aneurisma. Esse clipe possui uma força pré-determinada, sendo o tempo de compressão variável, de acordo com a força de fechamento do clipe. O modelo de lesão por compressão de clipe resulta em déficit funcional, correlacionando-se com sequelas neurológicas, observadas na prática diária, podendo ser reproduzido com relativa facilidade e alto custo (VON EULER, SEIGER et al., 1997).

Devido ao alto custo desses métodos, o presente trabalho, executado em um modelo de lesão medular padronizado de Torres et al. (2010), utilizando instrumento

com finalidades semelhantes ao *Impactador New York University (NYU- Laboratório de Neurocirurgia da Universidade de Nova Iorque)*. É de baixo custo, com mecanismo alternativo, chamado de Estereotáxico Modificado, utilizando um estereotáxico simples, onde um peso de 50,5g ou 70,5g a nível de T9-T10, durante cinco minutos, causando trauma medular (TORRES et al., 2010).

Algumas modificações, geradas pela compressão medular, inflingiu modificações quanto a estrutura muscular. Evidenciando músculos de indivíduos, com espasticidade expressando alta densidade da matriz extracelular, segundo Lieber et al. (2003). Entretanto, essa matriz apresenta capacidade mecânica inferior devido a sua organização. O aumento da rigidez intrínseca da fibra muscular, causa contratura e perda de sarcômero, de acordo com Mirbagheri et al. (2001).

A fisioterapia neurológica, direcionada as sequelas traumáticas, preocupa-se com redução da espasticidade, associada aos exercícios para melhor realização de um desempenho funcional. O maior desafio é o recrutamento da força adequada para esse desempenho (JONG-MAN e DUCK-HYUN, 2002); tendo como meta principal, o tratamento fisioterapêutico: preparar, manter e/ou aprimorar a função motora – resultando em qualidade, através do controle da espasticidade (TEIVE et al., 1998).

Os tratamentos medicamentosos, utilizados em via oral, na reabilitação dos pacientes com lesão medular. Associados, frequentemente, aos programas de reabilitação motora, objetivando a diminuição do tônus muscular global. Os principais medicamentos (benzodiazepínicos, baclofen, tizanidina, dantrolene sódico) são limitados por produzirem sedação, cansaço, sonolência, déficit de atenção e memória, relacionadas à depressão do sistema nervoso central (SNC). Todos esses medicamentos inibem temporariamente a hipertonia, evitando a evolução cirúrgica ortopédica aos pacientes, tendo seus efeitos colaterais cognitivos dependentes das doses indicadas (TILTON, 2006; QUAGLIATO et al., 2006).

Outra forma de tratamento, são as injeções de toxina botulínica ou aplicação fenol, proporcionando redução de tônus de forma local. Apresenta farmacologia dependente de sete sorotipos variados de A a G, derivados da bactéria *Clostridium botulinum* com variação em alvo, duração e toxicidade (TILTON, 2006; QUAGLIATO et al., 2006).

Neste contexto, os produtos originários das plantas medicinais, agregam valor terapêutico a novas possibilidades de tratamento em geral, como na prevenção, cura ou tratamento de enfermidades. A fitoterapia é considerada alternativa eficiente em soluções terapêuticas, utilizada por grande parte da população pertencente aos países desenvolvidos, e até, em desenvolvimento (PINTO et al, 2006; VICTORIO et al, 2009; SILVA et al., 2010).

Diante a essa oportunidade, a *Alpinia zerumbet* ou *A. speciosa* [K. Schum (Zingiberaceae)] - planta conhecida popularmente como “colônia”. Indicada em ação anti-hipertensiva; diurética; sedativa; antioxidante; antifúngica; antiulcerogênica; relaxante de tônus basal. Segundo as pesquisas de Mendonça et al. (1991); Laranja et al. (1992); Prudent et al. (1993); Bezerra et al. (2000).

A ação antiespasmódica em músculos estriados ainda não foi investigada. Seu óleo essencial apresenta-se rico em terpenos, a exemplo do 1,8 cineol e terpineno-4-ol. Tais princípios ativos são referenciadas por apresentarem atividades nos canais de cálcio ou serem competidores pós-sinápticos da acetilcolina em músculos lisos (MENDONÇA et al., 1991; BEZERRA et al., 2000; NASCIMENTO 2005). Já as ações do óleo essencial foram moduladores dos canais de cálcio do tipo L (SANTOS et al., 2011).

Esses conceitos justificam este trabalho pela necessidade do entendimento das alterações estruturais dos músculos espásticos, expresso por modelo experimental de lesão medular espinhal em ratos. Animal que reproduzem condições semelhantes aos seres humanos, e em específico deste estudo com sequelas de músculos espásticos e contraturados. Corroborando assim com o estudo de Gattazzo et al., (2014), afirmam que a rigidez encontrada nas estruturas musculares, proporcionando uma adequada força tensora muscular.

2. OBJETIVOS

Analisar o efeito da aplicação tópica do óleo essencial de *A. zerumbet* (OEAz) sobre as alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental de lesão medular.

Mensurar as alterações neurológica dos músculos espásticos após lesão.

Identificar as alterações histopatológicas da fibra muscular, como miofibrila, endomísio e perimísio.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Traumatismo Raquimedular (TRM)

O TRM, lesiona a medula espinhal, com sequelas permanentes, com ou sem presença de danos sensoriais e motores ao indivíduo lesado, gerando comprometimento neurofuncional, como também, danos em sua qualidade de vida (DEFINO, 1999; GASPAR et al., 2003; KUBO et al., 2008).

De acordo com Pereira; Jesus (2011), os dados epidemiológicos, a respeito da incidência e prevalência de lesão medular no Brasil, não são precisos. São baseados em estimativas. Entretanto, o conhecimento desses dados é fundamental para elaboração de medidas preventivas, evitando a ocorrência de fatores preconizados da lesão (GASPAR et al., 2003). Em relação ao nível da lesão, estão dispostos em prevalência: 55% na região cervical, 15% na torácica, 15% na transição toracolombar e 15% na lombossacra (MEYER et al, 2003).

As manifestações clínicas e comprometimento neurológico são diretamente ligadas ao grau e nível da lesão. Quanto ao grau, as lesões são classificadas como completas ou incompletas. As lesões completas caracterizam-se pela interrupção dos tratos nervosos, resultando em perda sensitiva e paralisia motora total abaixo do nível da lesão. Em uma lesão incompleta, ocorre preservação parcial do controle de estruturas corticais sobre a medula, nos níveis abaixo do local de lesão (HOLLY et al., 2002; CHESNUT, 2004; CEREZETTI et al., 2006; GARCIA, 2006; TAGLIAFERRI et al., 2006). Apresentado por Torres (2008), os níveis da lesão medular foram dispostos no quadro abaixo:

QUADRO 1: Alterações reflexas em relação aos níveis de lesão no indivíduo com TRM.

ALTERAÇÕES REFLEXAS				
Localização na medula espinhal*	Paresia/ Paralisia	Membros torácicos	Membros pélvicos	Outros sinais
Cervical (C1-C5)	Hemiparesia ipsilateral até tetraplegia	Normal a aumentado	Normal a aumentado	Dor e rigidez cervical
Cervicotorácia (C6-T2)	Hemiparesia ipsilateral até tetraplegia	Diminuído a ausente	Normal a aumentado	± Síndrome de Horner (T1-T2), perda ipsilateral do reflexo do músculo cutâneo do tronco (C8/T1)
Toracolombar (T3-L3)	Paraparesia espástica até paraplegia	Normal	Normal a aumentado	Retenção urinária e fecal; ± postura de Schiff-Sherrington
Lombossacra (L4-S3)	Paraparesia até paraplegia flácida (L4-S1); normal (apenas S2-S3)	Normal	Diminuído a ausente	Incontinência urinária e fecal; cauda flácida

Fonte: Torre, 2008.

Após o traumatismo da medula espinhal, o paciente apresenta quadro de choque medular, consistindo em ausência das funções neurológicas, abaixo do nível da lesão. O choque medular ocorre independente do grau e tempo de permanência do trauma (DEFINO, 1999; GRAVE et al, 2003).

Em sua fase crônica, o paciente apresenta alterações na motricidade, sensibilidade superficial e profunda, elevação perigosa da pressão arterial sistêmica (PAS), hipotensão ortostática, alteração da termoregulação e distúrbios neurovegetativos dos segmentos corporais, localizados abaixo do nível do comprometendo. Algumas complicações secundárias como: bexiga e intestino neurogênicos; úlcera de pressão; trombose venosa profunda e ou modificação do tônus muscular, são responsáveis pela dependência funcional, acarretando limitações no desempenho e restrições em participações sociais (FRANÇA et al., 2011).

O processo fisiopatológico do TRM, caracteriza-se em duas fases: a primária; e secundária. Na primária, o trauma inicial é físico, com eventos de até 8 horas, por lesão de tração, compressão e/ou ruptura mecânica das estruturas neurais. Desencadeia alterações locais micro lesionados vascularmente, gerando edema, isquemia, liberação de citotóxicos influenciam a via inflamatória, por consequência, mudança de eletrólitos, lesão nas células nervosas, rompimento de axônio e necrose da substância cinzenta. Já a fase secundária, marcada por uma sequência de reações

bioquímica no período de 01 a 04 semanas (SCHWAB; BARTHOLDI, 1996; NICHOLLS; SAUNDERS, 1996; DEFINO, 1999).

A resposta inflamatória pós traumática desempenha um papel crítico interferindo nos complexos celulares e moleculares. (DASARI, 2014). Essa cascata de eventos inflamatórios decorrente de isquemia, provocada por choque neurogênico causado pela compressão por fragmento vertebral, com fluxo sanguíneo cessado, com alteração da autorregulação da região. A ruptura da membrana celular aumenta a produção dos radicais livres, causadores da progressiva oxidação dos ácidos graxos, chamada peroxidação lipídica, desabilitando a cadeia enzimática mitocondriais, com a alteração do DNA e de suas proteínas associadas - inibidoras do sódio-potássio ATPase causando a necrose e apoptose celular (DASARI, 2014).

Ainda na segunda fase, a caracterização da inflamação é originária do envolvimento dos componentes celulares como: neutrófilos, macrófagos, células T, citosinas e prostaglandinas. Após a lesão medula, a região é infiltrada rapidamente por neutrófilos, os quais, ao secretar enzimas lipídicas e citosinas, prejudicam o tecido local, promovendo recrutamento de outras células inflamatórias (DASARI, 2014). O tecido cicatricial e cistos formados no interior da medula espinhal, são decorrentes da morte de axônios e células nervosas que não foram inicialmente lesados (SCHWAB; BARTHOLDI, 1996; NICHOLLS; SAUNDERS, 1996; DEFINO, 1999).

3.2 Fibra muscular

A fibra muscular é caracterizada pelo fenótipo que controla a expressão entre a cadeia pesada da miosina e as proteínas miofibrilares, reguladoras da plasticidade e especialização do músculo esquelético. A partir do fator de transcrição gênica ocorre diferenciação miogênica por transformação das células mesodermiais mioblastos. A ação dos fatores miogênicos reguladores e o myogenin transformam-se em miócitos. O conjunto dessas células irá caracterizar a fibra muscular (HAWKE, 2001; RAUE, 2006; WILLOUGHBY, 2002).

Na fibra muscular, células satélites são formadas na periferia dos mioblastos responsáveis pelo crescimento e regeneração muscular. A ativação de novas células por formação de novas miofibrilas será estimulado pela contração muscular, mantendo assim, a função das estruturas musculares. (HAWKE, 2001).

O tecido muscular esquelético estriado caracteriza-se por endomísio, perimísio e epimísio. O envolvimento da fibra muscular é constituído por camada lipídica responsável pela condução da onda de despolarização, conhecido por sarcolema, com camada de filamentos de colágeno. No interior da fibra, encontra-se o sarcoplasma, nele localizam-se as organelas e entre elas o retículo sarcoplasmático, caracterizado por canais tubulares, onde propagam-se uma onda de despolarização por toda a fibra muscular, proporcionando o regulamento do fluxo de cálcio (FLÜCK, 2003).

A contração muscular ocorre após a despolarização da fibra, os filamentos finos representados por actina, tropomiosina, troponina e tropomodulina, assim como os filamentos grossos, pela miosina e proteína. As cadeias, leve e pesada, formam estruturas envolvendo os filamentos já apresentados. Em uma das cabeças da miosina se liga ao ATP (trifosfato de adenosina). Outras estruturas também são encontradas na fibra, titina, desmina e a nebulina. Histológica e morfológicamente, as fibras são classificadas quanto a sua atividade enzimática e o potencial oxidativo, pertencentes as fibras de contração lenta, do tipo I, e fibras rápidas do tipo II (SCHIAFFINO, 1996; FLÜCK, 2003).

3.3 Espasticidade

A espasticidade muscular tem sido grande desafio tanto para o tratamento medicamentoso como para a fisioterapia. Denominada como uma resistência dependente da velocidade do movimento, essa por sua vez é caracterizada pelo aumento do tônus muscular, exacerbação dos reflexos miotáticos e hiperatividade do músculo, causando alteração na estrutura e contração muscular, presença de espasmos musculares e clônus (FAVA, 2011).

As contraturas musculares são limitantes ao movimento, aumentando assim a rigidez passiva (SMITH et al., 2011). Tais características são reconhecidas como fatores limitantes, interferindo na qualidade de vida, afetando diretamente na funcionalidade e independência do indivíduo (FAVA, 2011; LIEBER et al, 2003).

As alterações observadas na musculatura espástica, são decorrentes da lesão no motoneurônio superior. De acordo com Bakheit et al. (2011), a existência da modulação adequada do tônus muscular depende de uma remodelação estrutural, expressada pela cadeia pesada da miosina de fibra tipo IIx. Existe também redução

no comprimento e volume do ventre muscular, com aumento de fibras do tipo I e de tecido conjuntivo extracelular nos músculos espásticos (DIAS et al., 2013).

A histopatologia referida por Ito et al., (1996), demonstrada na musculatura espástica da paralisia cerebral, por biópsia do gastrocnêmio, evidenciou predominância das fibras do tipo I sobre as tipo II. Já Lundy-Ekman (2004) e Patten et al. (2004) relataram transformações tanto em fibras musculares do tipo I como em tipo II, contribuindo para a diminuição das atividades funcionais dos pacientes.

O estudo de Smith (2011), relata músculos isquiotibiais de crianças com paralisia cerebral apresentam aumento na tensão passiva, uma vez que Lieber et al. (2004), complementa um aumento do material da matriz extracelular devido a hipotrofia muscular combinada com a rigidez elevada. Para Olsson et al. (2006), essa hipotrofia, decorrente do aumento da concentração de colágeno, proporciona um músculo espástico com propriedades mecânicas inadequadas. Somado a isso, Ranatunga (2011) relata o aumento da tensão passiva ligado as alterações na matriz extracelular, como também, no encurtamento do músculo, decorrentes da atuação do cálcio em fibras normais e espásticas.

Segundo Gao; Zhang (2008), em estudo realizado com eletroestimulação no gastrocnêmio, houve redução quantitativa de sarcômeros ao longo das fibras comprometidas em pacientes com acidente vascular encefálico (AVE). Essas alterações foram evidenciadas no estudo de revisão de Rose; McGill (1998).

Poucos estudos demonstram alterações apresentadas nos músculos hipertônicos, decorrentes do aumento nos níveis de Ca^{++} (representados por níveis aumentados de tensão passiva), e das propriedades intrínsecas de músculos espásticos, envolvendo o tecido conjuntivo, titina e a matriz extracelular (LIEBER et al, 2003).

A hiperatividades dos canais de cálcio nesses músculos, causadas pelas alterações motoneurônios, após transecção medular em ratos, causa hiperexcitabilidade das vias reflexas espinhais com períodos prolongados de despolarização, após duas semanas da lesão (HARRIS et al., 2007; NORTON et al., 2008; MURRAY et al., 2010; RANK et al., 2011), decorrentes das alterações no volume aumentado de sódio e cálcio (LI; BENNETT, 2004). A presença do sódio e atividades dos canais do cálcio do tipo L também Justifica a fase de choque medular em decorrência da inativação dos mesmos (LI; BENNETT, 2003). Essa hiperativação por despolarização é decorrente de acetilcolina (LI; BENNETT, 2004; LOMO;

SLATER, 1980), produzindo potencial pós-sináptico no músculo por influxo intenso de sódio nos túbulos T, de acordo com Prado et al. (2002) e Ribeiro et al. (2006).

Os estímulos ao chegar aos túbulos T ativa os canais rianodínicos, localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), deixando-os permeáveis ao cálcio (Ca^{+2}) por ação da miosina Ca^{+2} -ATPase, aumentando a concentração desse no RS. Uma vez o cálcio liberado no RS, irá se ligar ao complexo troponina-tropomiosina, especificamente à troponina C, liberando o sítio de ligação da actina para a miosina. Essa liberação permitirá produção de tensão e contração muscular (BERCHTOLD et al, 2000; DULHUNTY, 2002; CHENG; LEDERER, 2008).

As pontes cruzadas, segundo Gordon et al. (2000) e Cheng; Lederer (2008), são influenciadas por mecanismo puramente mecânico, alterando a cinética de liberação de ADP advindo do ATP (RATZ; SPEICH, 2010). A angulação das pontes cruzadas acarreta geração de força vinculada ao deslizamento das miofibrilas diretamente proporcional à tensão passiva e concentração de cálcio, ou seja, quanto mais cálcio maior a tensão passiva (GORDON et al., 2000; CHENG e LEDERER, 2008). Reforçado na espasticidade, o evento relatado por Roy et al. (2012) evidencia alterações musculares associadas ao músculo, após uma lesão medular, incluindo aumento da tensão passiva. Esse aumento também é reforçado por Bakheit et al. (2011) e Roy; Reggie (2012).

Já Olsson et al. (2006) apresenta aumento nas proporções de fibras musculares rápidas, expressadas pelo tipo IIx, sendo reduzidas proporcionalmente devido ao remodelamento ultraestrutural dos miócitos espásticos. Resultado semelhante encontrado por Póten e Stal (2007) em um estudo feito no músculo bíceps braquial em adultos jovens com paralisia espástica. A maior expressão das fibras IIx prevaleceram em relação as fibras Ia. Outras alterações encontradas por Olsson et al (2006) foram diminuição dos capilares e do volume mitocondrial.

Diante desses achados, os fenômenos fisiopatológicos podem se comportar da seguinte forma: O motoneurônio medular quando lesionado após duas semanas, apresenta hiperatividade em seus canais de cálcio do tipo L, induzindo excesso de cálcio em canais semelhantes localizados no sarcoplasma, causando hiperatividade na banda-M da titina. A potencialidade das ligações cruzadas induzirá um aumento da tensão passiva. Essa alteração patológica modifica a matriz extracelular e colágeno, enrijecendo-os, induzindo em ciclo viciosos tensão passiva e ligações cruzadas aumentadas. Essa característica na estrutura muscular, principalmente da titina

induzirá a expressão da MyHC do tipo IIX, caracterizada por pouco metabolismo glicogênico resultando contração rápida e de fácil fadiga, assim os músculos espásticos são rígidos e fracos levando a uma hipotrofia muscular (LIEBER et al, 2004).

3.4 Tratamento

O tratamento para o TRM no Brasil tem custo anual médio de 300 milhões de dólares tendendo ao crescimento, decorrente da qualidade de tratamento aumentando a incidência de lesados medulares, assim como, a expectativa de vida (FAVA, 2011). A medicação utilizada no momento agudo é a metilprednisolona com mecanismo de ação por inibição da peroxidação lipídica (LAURINDO et al., 2009).

Em relação ao tratamento são relatados o bloqueio muscular, cirúrgicos ou farmacológicos, além do controle da espasticidade. Ambos propõem-se amenizar a hipertonía (FELICE; SANTANA, 2009). Os alopáticos vêm sendo utilizados há alguns anos de forma corriqueira e os mais utilizados são o baclofen, o diazepam, dantrolene, a clonidina, a tizanidina, a clorpromazina, além de morfina. Estas medicações atuam por diferentes mecanismos, que resultam em diminuição da excitabilidade dos reflexos espinhais (TEIVE et al., 1998).

As formas de tratamento local são duas: a injeção de fenol para bloqueio da condução nervosa periférica (TEIXEIRA et al., 2004). E a toxina botulínica, essa por sua vez é uma neurotoxina produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*, com atuação na junção neuromuscular, bloqueando a liberação do neurotransmissor acetilcolina, em nível pré-sináptico, porém como consequência provoca paresia muscular (TEIVE, 1998).

Apesar da existência dessas formas de tratamento se busca na ciência outras formas de tratamento com produtos naturais, uma vez que nos últimos anos tem-se verificado um crescente interesse por fitoterápicos. As observações populares sobre o uso e efeito positivo de produtos naturais contribuem de forma relevante para a divulgação das ações terapêuticas dos vegetais com o objetivo de melhorar a saúde da população (SOUSA et al., 2008; MACIEL et al., 2002).

3.5 Fitoterapia

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na medicina mundial. Esta tendência tem contribuído significativamente

para o consumo não só de plantas medicinais, como também de medicamentos fitoterápicos. Os conhecimentos acumulados ao longo do tempo mostram que tais produtos podem causar efeitos nocivos e provam que o mito “O que é natural não faz mal” é uma verdade insustentável (BEZERRA et al., 2012).

Quanto às práticas da medicina tradicional, observou-se que são baseadas em crenças existentes há centenas de anos, prevalecendo até hoje, caracterizando a tradição de cada país, passando conhecimentos de uma geração a outra com aceitação fortemente condicionada aos fatores culturais (MARTINS, 2000).

O uso de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças aumentou com o avanço e a modernização da farmacoterapêutica, possibilitando uso de plantas medicinais sob a forma de medicamentos fitoterápicos na busca do equilíbrio saúde-doença (PERFEITO, 2012).

As formas de utilização terapêutica das plantas são várias e entre essas se encontra a utilização dos óleos essenciais. Obtidos de diferentes materiais vegetais como flores, folhas, frutos e raízes originam-se do metabolismo secundário destes vegetais, sendo uma excelente forma de aplicação tópica, por apresentarem bom índice de absorção (GEROMINI et al., 2012).

Os óleos essenciais são utilizados há bastante tempo (LORENZI, 2000), principalmente por suas possibilidades terapêuticas (LEAL-CARDOSO; RAVASIO et al., 2004; ZWENGER; BASU, 2007). São constituídos por compostos orgânicos de moléculas de hidrocarbonetos classificados como terpenos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e fenóis, além de outros (GUENTHER, 2008). E seu uso farmacológico atribuído aos seus princípios ativos, dentre os quais se destacam o óleo essencial comumente extraído de folhas, os rizomas, as hastes e flores.

Os componentes voláteis do óleo da *A. zerumbet* (OEAz) têm sido objeto de pesquisa de inúmeros estudos (LAHLOU et al., 2003, Rezende et al., 2003). Os terpenos são os principais constituintes do OEAz decorrentes do metabolismo primário e secundário (TRAPP; CROTEAU, 2001; DEGENHARDT et al., 2003; GUENTHER, 2008). São utilizados amplamente em alimentos, perfumarias, medicamentos tradicionais e alternativos, e classificados em hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos e tetraterpenos (GUENTHER, 2008). Dentre os constituintes químicos majoritários do

óleo essencial estão o terpineno-4-ol, o 1,8-cineol e o γ -terpineno (LAHLOU *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2011).

3.6 *Alpinia zerumbet*

A família Zingiberaceae, contém mais de 53 gêneros e 1.200 espécies, sendo a *Alpinia* um dos gêneros mais encontrados (KRESS *et al.*, 2005). *Alpinia zerumbet* (*A. zerumbet*) ou *Alpinia speciosa* [K. Schum (Zingiberaceae)] é uma planta facilmente encontrada no nordeste brasileiro, e conhecida popularmente como “colônia”, “flor da redenção”, “bastão do imperador” e “água de alevante”. É uma planta herbácea, robusta e perene com colunas de 2 a 3 metros de altura, lisa e verde com folhas oblongas e pontudas. Além de alternadas são completas e simples, com base aguda e margem inteira. Suas flores são alvas com lacínios róseos no ápice, dispostas em cachos grandes levemente aromatizadas, sendo o fruto em formato de cápsula (MEDEIROS, 2000; KRIECK *et al.*, 2008).

A espécie *A. zerumbet* teve seus constituintes químicos determinados inicialmente por Kimura *et al.* (1966) e foram: alcaloides; flavanóides (cardamonim e isalpin); catequina e epicatequina (MASUDA, ET AL., 2000 E VICTÓRIO, ET AL., 2009). Os principais constituintes do óleo essencial dessa espécie são mono e sesquiterpenos, com maior concentração do terpinen-4-ol, presente em todos os órgãos da planta em quantidades diferentes. Já o α -terpineol é o principal constituinte da flor e rizoma e o 1,8 cineol da folha. (JEZLER, 2010).

Nas pesquisas pré-clínicas realizadas por Mendonça *et al.* (1991) o extrato aquoso (10 g/kg) foi praticamente atóxico com indução e duração do sono aumentado; inibição de acetilcolina e bradiginina em íleo de cobaia; além de diminuição do ritmo cardíaco e resposta ionotrópica atrial e diminuição da pressão sanguínea. A atividade antifúngica foi demonstrada por Prudente *et al.* (1993) e Tawata *et al.* (1996). O efeito antioxidante com frações metanólicas foi descrito por Masuda *et al.* (2000), e ótima atividade moluscicida e larvicida, segundo Lima *et al.* (2013).

Em 2008, Costa *et al.*, utilizando extrato acetônico e metanólico das folhas, avalia que esses extratos não apresentam ação citotóxica nas células HEP-2. Ainda em 2008 Lin *et al.* relatam que o pó das sementes da *A. speciosa* apresentam efeito

hepatoprotetor demonstrando ser um agente hipolipemiante com atividade de elevar a lipoproteína de alta densidade (HDL- C) combatendo assim o colesterol.

Já as pesquisas clínicas com a *A. zerumbet* descrevem os resultados como redutor de pressão arterial, efeito esse também presente ao ingerir o chá, observado por Laranja et al. (1991; 1992); e atividade biológica de hipotensão, diurético e antiulcerogênica, descrito por Mpalantinos et al. (1998) decorrentes do extrato aquoso da planta relatada.

Nas pesquisas com *A. zerumbet* vinculadas à contração muscular, são citadas com os seguintes resultados: ação anticolinérgica competitiva que inibe a contração muscular (VANDERLINDE e CADEN, 1986; VANDERLINDE; LAPA, 1988; VANDERLINDE, 1991; CORRÊA et al., 2001), atividade antiespasmódica e efeito relaxante do tônus basal de íleo de ratos (BEZERRA et al., 2000), vaso-relaxante por diminuir atividade de tônus simpático (LAHLOU et al., 2002), além de moduladora da concentração do cálcio no músculo liso, de forma dose dependente (MENDONÇA et al., 1991; BEZERRA et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2005).

Porém, sua ação antiespasmódica, em músculos estriados em modelos experimentais estão inicialmente investigados. Nessa condição os animais desta pesquisa foram tratados com OEAz com possível resultado de benefícios, tanto para a espasticidade como para as contraturas musculares. Essa hipótese partiu do pressuposto da ação já confirmada de regulação do cálcio em seus canais do tipo L voltagem dependente, em estudos realizados por Santos et al., 2011, parceria nossa com um grupo em Minas Gerais. Outro estudo respalda essa hipótese, Cândido e Xavier-Filho (2012), ao tratar crianças com paralisia cerebral espásticas com OEAz durante um mês. Ao final do tratamento, essas crianças melhoraram a tensão passiva (espasticidade) como também melhoraram a função motora. Os músculos espásticos apresentaram alterações na tensão passiva e das propriedades intrínsecas das fibras estriadas envolvendo o tecido conjuntivo, titina e a matriz celular, pressupõem-se que aja uma ação do OEAz influenciando as estruturas miofibrilares alteradas pela própria contratura e naturalmente estimuladas ao excesso de cálcio no sarcoplasma, segundo Catterall (1991), Mickelson e Louis (1996), Lieber et al. (2003) e Olsson et al. (2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de pesquisa

Trata-se de um estudo pré-clínico, experimental e comportamental que foi realizado no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural e no Laboratório de Estudos Biológicos e Produtos Naturais do Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes.

4.2 Material Vegetal

As amostras do OEAz à 33% foram doadas pela empresa Hebron Farmacêutica, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Ltda, com sede em Pernambuco. Esse medicamento foi confeccionado à partir da coleta de folhas verdes transportadas em carro climatizado, tendo seu óleo essencial extraído por arraste a vapor (hidrodestilação) e seu veículo um óleo vegetal.

Foi realizada a análise cromatográfica no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com objetivo de identificar a composição do produto. Utilizado a 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.

4.3 Animais

Foram utilizados 30 ratos da raça Wistar, adultos, de ambos os sexos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Os animais com peso entre 250 a 300 gramas, acomodados nas gaiolas de propriopileno em grupos de 6 animais, em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Ao final de cada experimento os animais são sacrificados e, posteriormente, incinerados no Biotério da Universidade Tiradentes. O estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA de nº 020513 (ANEXO 2) da referida universidade.

4.4 Procedimento cirúrgico

Foi utilizado um modelo experimental adaptado de acordo com o estudo 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 pesados e administrado o relaxante muscular Cloridrato de Ketamina a 10% (95mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal, onde a cada 100 gramas do rato foi administrado 0,01 mg tanto do anestésico quanto do relaxante muscular com duração do efeito por duas horas.

Os animais após anestesiados foram colocados em decúbito ventral com exposição do dorso para a realização da tricotomia (região torácica) e em seguida submetido à assepsia com a solução de polivinil pirrolidona iodo.

Após a assepsia foi realizada uma incisão vertical de aproximadamente 5cm de comprimento, sobre os processos espinhosos, expondo tecido subcutâneo, com afastamento subperiostal da musculatura paravertebral para a exposição da coluna vertebral. Desta incisão foi localizada, por meio da palpação da última costela, as vértebras T9 e T10 para assim realizar a laminectomia, expondo a medula espinhal recoberta pela dura-máter intacta. Com a exposição do canal medular foi realizado o trauma mecânico utilizando o aparelho Estereotáxico adaptado confeccionado pelos pesquisadores composto de uma haste fina de ponta romba (01mm²) com peso acoplado de 70g por 05 minutos. Logo após a compressão medular a musculatura e a pele do rato foram suturadas com fio 4.0 poliamida monofilamento não absorvível.

Nos cuidados pós-operatório foi realizado a antibioticoterapia profilática com pentabiol reforçado intraperitoneal em dose única (0,1mg/100g), e acomodação de três animais por gaiolas, estas contendo com água e ração, em ambiente climatizado.

4.5 Grupos e doses

Foram realizados 5 grupos com 6 animais cada, totalizando 30 animais foram submetidos a tratamento por cinco dias na semana durante 30 dias. A dose foi de 0,05ml/2Kg o OEAz (na diluição de 33% do OEAz em 67% de óleo vegetal). Nos grupos tratados com Fisioterapia foi realizada as mobilizações passivas de flexo-extensão de joelho e tornozelo direito e seu controle apenas a movimentação diária normal sem nenhum estímulo, em ambas as patas. Os grupos foram divididos em:

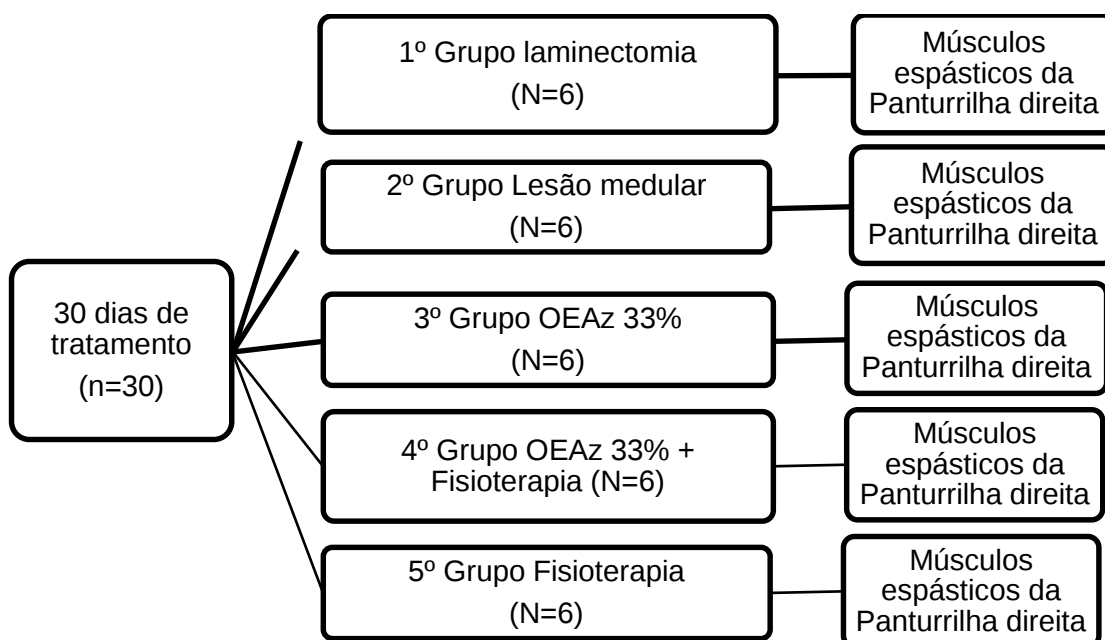


Figura 1: Organograma dos grupos experimentais, o 1º grupo laminectomia; 2º grupo lesão medular; 3º grupo OEAz (OEAz 33%); 4º grupo OEAz (OEAz 33%) associado ao tratamento de Fisioterapia e o 5º grupo fisioterapia.

O tratamento foi iniciado após 15 de lesão medular compressiva somando 30 que os animais foram tratados por 30 dias. Desta forma, os músculos paréticos se encontram com espasticidade e contratura muscular, pois em projeto piloto foi percebido que em 14 dias os animais já tinham saído na fase flácida e estariam na fase de espasticidade, andando com limitação parcial demonstrando contraturas na movimentação passiva das articulações do joelho e tornozelo.

4.6 Protocolo de tratamento

Os animais submetidos ao tratamento do OEAz, Fisioterapia, Fisioterapia + OEAz, Lesão medular e Laminectomia iniciaram o tratamento diário a partir do 15º dia de pós operatório totalizando 30 dias de tratamento. Durante todas as visitas diárias os animais receberam massagens abdominais com o objetivo de esvaziar a bexiga e a defecção favorecendo o bem estar fisiológico do animal, visto que a lesão medular pode causar transtornos vesicais e esfinterianos.

4.7 Protocolo de avaliação

Foram realizados testes funcionais para avaliação comportamental e neurológica em oito avaliações no 1º, 3º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 45º dia. A partir dessas avaliações foi possível observar o comprometimento funcional e comportamental na lesão aguda, subaguda e crônica. As avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador para um resultado mais fidedigno.

São realizados 05 testes para compor a avaliação comportamental e neurológica: o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), o teste de sensibilidade dolorosa (SD), o posicionamento proprioceptivo (PP) e tátil (PT).

Durante a avaliação do BBB foram avaliados os seguintes escores: movimentos das patas, coordenação, firmeza, comprometimento do tronco. E como subitens desses o: movimento do membro posterior, posição do tronco, abdome, posição da pata, caminhada, posição predominante da pata, instabilidade do corpo e rabo. O BBB avalia desde a ausência total de movimentos (escore 0) até o movimento normal (escore 21). Para esta avaliação o rato é colocado em um campo aberto e observado de dois a quatro minutos (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995; SEDÝ, 2008).

No teste SD é realizada uma pressão na prega interdigital das patas traseiras, utilizando uma pinça hemostática. A resposta varia de acordo com a tentativa ou reação de morder, vocalizar e velocidade de retirada da pata.

Na avaliação PP é utilizada para verificar se o animal apresenta capacidade para retornar a posição normal, a pata do rato é posicionada em flexão, proporcionando o contato do dorso em alguma superfície rígida. Enquanto no PT, o dorso da pata entra em contato com a borda lateral de uma superfície rígida, apresenta como objetivo avaliar a precisão e rapidez com que o animal irá colocar sua pata.

Para todas essas três avaliações foi utilizado um escore classificado como 0 (ausência de reação), 1 (reação diminuída) e 2 (reação normal).

Todas avaliações foram filmadas para evitar erros nas determinações de suas escores.

4.8 Análise Histológica

Para caracterização histopatológica, os ratos foram eutanasiados, retirados os músculos gastrocnêmio e colocados no formal a 10%. Na confecção das laminas foi realizado o processo de desidratação e clareamento em álcool e xilol, cada processo com duração de uma hora. Após este procedimento foi realizada a inclusão do material na parafina e em seguida, a formação dos blocos com o tecido. O corte do material emblocado foi realizado no micrótomo na espessura de 5 µm. As laminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para a análise histológica, segundo Albuquerque Júnior et al. (2009).

Nas laminas foram analisadas as seguintes variáveis: miofibrilas, endomísio, perimísio, epimísio e feixe muscular. E fotografadas com microscópio (Olympus, BX51, Tokio, Japão) equipado com uma câmera digital (Olympus, DP71, Tokio, Japão). As imagens foram adquiridas com resolução de 2040 x 1536 pixels e salvas em arquivo no formato TIF.

4.9 Análise estatística

O programa estatístico utilizado foi GraphPad Prism 6.01. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade das variáveis estudadas. Já as análises de comparações múltiplas utilizou a análise de variância simples por Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn's. Foi considerado $p < 0.05$.

5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, S. A. L.; PIRES, A. J.; REIS, P. F.; LIMA, O. S.; RIBEIRO, G. M. A.; CARDOSO, C. J. 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.

ALDERTON, J.M.; STEINHARDT, R.A. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes *trend card*, 2000;10(6): 268-272.

BASSO, D.M.; BEATTIR, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field test in rats. *J Neurotrauma* 1995; 12: 1-21.

BENNETT, D.J., GORASSINI, M., FOUAD, K., SANELLI, L., HAN, Y., CHENG, J. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 1999; 16: 69–84,

BENNETT, D.J., LI, Y., HARVEY, P.J., GORASSINI, M. Evidence for plateau potentials in tail motoneurons of awake chronic spinal rats with spasticity. *J. Neurophysiol.* 2001; 86, 1972–1982.

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.

BEZERRA, A. M. F.; BEZERRA, K. K. S.; SOUSA, L. C. F. S.; SOUSA, J. S.; BORG, M. G. B. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade de mimoso no município de Paulista, Paraíba – Brasil. Mossoró – RN, *Revista Verde*. 2012; 7(5): 06-11.

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, 4(7): 549-51.

BOOTH, C.M.; CORTINA-BORJA, M.J.; THEOLOGIS, T.N. Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. *Dev Med Child Neurol.* 2001;43(5):314-20.

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): 110-5.

CANTINI, M. Et al. Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 202(3): 1688-1696,.

CEREZETTI, C.R.N.; NUNES, G.R.N.; CORDEIRO, D.R.C.L.; TEDESCO, S. Lesão Medular Traumática e estratégias de enfrentamento: revisão crítica. São Paulo. *O Mundo da Saúde* 2012, 36(2):318-326.

CHESNUT, R.M. Management of brain and spine injuries. *Critical Care Clinical* 2004. 20(1): 25-55.

COSTA, V. S. P.; OLIVEIRA, L. D.; OYAMA, C. M.; AZUMA, C. S.; MELO, M. R. A. C.; COSTA FILHO, R. M. Perfil dos Pacientes com Trauma Raquimedular Atendidos pelas Clínicas Escolas de Londrina. RM / UNOPAR. *Cient., Ciênc. Biol. Saúde* 2010;12(2):39-44.

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 April 26; 6(2): 120-133.

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 April 26; 6(2): 120-133.

DEFINO, H.L.A. Trauma raquimedular. Ribeirão Preto. *Medicina* 1999; 32:388-400.

FAVA, J.E.. Traumatismo raquimedular: Características clínicas e epidemiológicas de pacientes atendidos em hospital de alta complexidade em Campo Grande – Mato Grosso do Sul [Dissertação] Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.

FELICE, T. D.; SANTANA, L. R. Recursos fisioterapêuticos (crioterapia e termoterapia) na espasticidade: revisão de literatura. *Rev Neuroc* 2009; v.17, n.1; 57-62.

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.

FORAN, J.R.H.; STEINMAN, S.; BARASH, I.; CHAMBERS, H.G.; LIEBER, R.L. Structural and mechanical alterations in spastic skeletal muscle. *Developmental medicine and child neurology* 2005. v.47, n.10, 713-7.

FRANÇA, I.S.X.; COURA, A.S.; FRANÇA, E.G.; BASÍLIO, N.N.V.; SOUTO, R.Q. Qualidade de vida de adultos com lesão medular: um estudo com WHOQOL-bref. *Rev Esc Enferm USP* 2011; 45(6):1364-71.

FRY, N.R., GOUGH, M.; SHORTLAND, A.P. Three-dimensional realisation of muscle morphology and architecture using ultrasound. *Gait Posture*. 2004;20(2):177-82.

GARCIA, A. Critical care issues in the early management of severe trauma. *Surgical Clinics North America* 2006. 86(6): 1359-87.

GASPAR, A.P.; INGHAM, S.J.M.; VIANNA, P.C.P.; SANTOS, F.P.E.; CHAMLIAN, T.R.; PUERTA, E.B. Avaliação epidemiológica dos pacientes com lesão medular atendidos no Lar Escola São Francisco. *Acta Fisiátrica* 2003. v.10, n.2, 73-77.

GATTAZZO, F.; URCIUOLO, A.; BONALDO, P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim. Biophys*, 2014. Aug;1840(8):2506-19.

GORASSINI, M.A., KNASH, M.E., HARVEY, P.J., BENNETT, D.J., YANG, J.F. Role of motoneurons in the generation of muscle spasms after spinal cord injury. *Brain* 2004;127, 2247–2258.

GORDON AMH; HOMSHER E; REGNIER M. Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiological Reviews* 2000, 80(2): 853-924.

HARDINGHAM, T.E., FOSANG, A.J. Proteoglycans: many forms and many functions. Bethesda. *FASEB Journal* 1992. 6: 861-701.

HARRIS, R.L., BOBET, J., SANELLI, L., BENNETT, D.J. Tail muscles become slow but fatigable in chronic sacral spinal rats with spasticity. *J. Neurophysiol.* 2006; 95:1124–1133.

HARRIS, R.L., PUTMAN, C.T., RANK, M., SANELLI, L., BENNETT, D.J. Spastic tail muscles recover from myofiber atrophy and myosin heavy chain transformations in chronic spinal rats. *J. Neurophysiol.* 2007; 97:1040–1051.

HARVEY, P.J., LI, X., LI, Y., BENNETT, D.J. 5-HT₂ Receptor activation facilitates a persistent sodium current and repetitive firing in spinal motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *J. Neurophysiol.* 2006; 96:1158–1170.

HAWKE, T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 2001;91(2):534-51.

HOLLY, L.T., KELLY, D.F., COUNELIS, G.J., BLINMAN, T., MCARTHUR, D.L., CRYER, H.G. Cervical spine trauma associated with moderate and severe head injury: incidence, risk factors, and injury characteristics. *Journal Neurosurgical.* 2002. 96(3): 285-91.

HOWARD, C.; FERRUCCI, L.; SUN, K.; FRIED, L.P.; WALSTON, J.; VARADHAN, R. Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community. *J Appl Physiol.* 2007. Jul;103(1):17-20.

ITO J, ARAKI A, TANAKA H. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. *Brain Dev.* 1996;18(4):299-303.

JONG-MAN, K.; DUCK-HYUN, A. Movement dysfunction in spastic hemiparesis: a problem of spasticity or muscular weakness? *Kautpt* 2002. 9(3).

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Matriz extracelular. *Biologia celular e molecular*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogn, 2005.

KUBO, T.; YAMAGUETTI, A.; IWATA, N.; YAMASHITA, T. The therapeutics effects of Rho-Rock inhibitors on CNS disorders. *Terapeutics and Clinics Rish Management* 2008, 4(3):605-15.

LARANJA SM; BERGAMASCHI CM; SCHOR N. Evaluation of acute administration of natural products with potential diuretic effects, in humans. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1991. 86(2): 237-40.

LAURINDO, R.D.; LEMES, M.B.; GUZEN, P.F.G.; GUZEN, F.P. Tratamento farmacológico e regeneração do Sistema Nervoso Central em situações traumáticas. *Revista Neurociências* 2009. 17(2):128-132.

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

LI, Y. E.; BENNETT, D.J. Correntes de sódio e cálcio persistentes causar potenciais planalto em motoneurônios espinhais de ratos crônicas. *J. Neurophysiol.* 2003;90:857-869.

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

LIMA, M.; FERRARI, S.E.; MARTINS, P.P.; GOMES, S.R.; LIANZA, S. Validation of the Santa Casa Evaluation of Spasticity Scale. *Arq Neuropsiquiatr* 2010;68(1):56-61.

MENDONÇA, V.L.M.; OLIVEIRA, C.L.A.; CRAVEIRO, A.A.; RAO VS; FONTELES MC. Pharmacological and toxical evaluation of *Alpínia speciosa*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1991; 86(2):93-7.

MENDONÇA, V.L.M.; OLIVEIRA, C.L.A.; CRAVEIRO, A.A.; RAO VS; FONTELES MC. Pharmacological and toxical evaluation of *Alpínia speciosa*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1991; 86(2):93-7.

MIRBAGHERI, M.M.; BARBEAU, H.; LADOCEUR, M.; KEARNEY, R.E. Intrinsic and reflex stiffness in normal and spastic, spinal cord injured subjects. *Experimental Brain Research*. 2001;141:446–59.

MOHAGHENGI, A.A.; KHAN, T.; MEADOWS, T.H. Differences in gastrocnemius muscle architecture between the paretic and non-paretic legs in children with hemiplegic cerebral palsy. *Clin Biomech* 2007;22(6):718-24.

- MURRAY, K.C., STEPHENS, M.J., BALLOU, E.W., HECKMAN, C.J., BENNETT, D.J. Motoneuron excitability and muscle spasms are regulated by 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor activity. *J. Neurophysiol.* 2010;105(2):731–738..
- NASCIMENTO, N. Terpinen-4-ol: mechanisms of relation on rabbit duodenum. *Journal of Pharmacology.* 2005;57(4):467-74.
- NICHOLLS, J.; SAUNDERS, N. Regeneration of imature mammals spinal Cord after injury. *Trends Neurosci* 1996;19(6):229-234.
- NORTON, J.A., BENNETT, D.J., KNASH, M.E., MURRAY, K.C., GORASSINI, M.A. Changes in sensory-evoked synaptic activation of motoneurons after spinal cord injury in man. *Brain.* 2008;131:1478–1491.
- OLSSON, M.C.; KRÜGER, M.; MEYER, L.H.; AHNLUND, L.; GRANSBERGI, L. type-specific increase in passive muscle tension in spinal cord-injured subjects with spasticity. *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;258:169-174.
- PEREIRA, C.U., JESUS R.M. Epidemiologia do Traumatismo Raquimedular. *Jornal Brasileiro Neurocirurgia.* 2011;22(2):26-31.
- PIERCE, S. R.; PROSSER, L.A.; LAUER, R. T. Relationship Between Age and Spasticity in Children With Diplegic Cerebral Palsy. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010;91:448-51.
- PRUDENT, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J.M.; MICHEL, G.; BRAVO, R. Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic, properties of the essential oil of the atoumau from Martinique (*Alpinia speciosa* K. Schum.) *Journal of essential oil research: JEOR* 1993;5(3):255-64.
- QUAGLIATO E; BANG G; BOTELHO LA; GIANINI MAC; SPÓSITO MMM; LIANZA S. Espasticidade: Tratamento Medicamentoso. *Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.* Junho de 2006.

RADLEY, H.G., GROUNDS, M.D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiology of Disease*. 2006;23:387–397.

RANK, M.M.,MURRAY, K.C., STEPHENS,M.J., D'AMICO, J., GORASSINI,M.A., BENNETT, D.J. Adrenergic receptors modulate motoneuron excitability, sensory synaptic transmission and muscle spasms after chronic spinal cord injury. *J. Neurophysiol*. 2011;105:410–422.

RAUE, U.; SLIVKA, D.; JEMIOLO, B.; HOLLON, C.; TRAPPE, S. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. *J Appl Physiol*. 2006;101(1):53-9.

RIVLIN, A.S., TATOR, C.H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 1978;10:38-43.

RODRIGUES, N.R.; LETAIF, O.B.; CRISTANTE, A.F.; MARCON, R.M.; OLIVEIRA, R.P.; BARROS FILHO, T.E.P. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(4):182-6

SAMBA, R.D.; LAURETANI, F.; FERRUCCI, L. Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults. *Arch Biochem Biophys* 2007;15;458(2):141-5.

SANTIAGO, L. M. M.; BARBOSA, L. C. S., GUERRA, R. O.; MELO, F. R. L. V. Aspectos sociodemográficos e clínicos de homens com lesão medular traumática em um centro urbano do nordeste brasileiro. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde* 2012;37(3):137-142.

SANTOS, B. A.; ROMAN-CAMPOS, D.; CARVALHO, M. S.; MIRANDA, F. M.; CARNEIRO, D. C.; CAVALCANTE, P. H.; CÂNDIDO, E. A.; XAVIER-FILHO, L.; CRUZ, J. S.; GONDIM, A. N. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca²⁺ current blockade. *Phytomedicine* 2011;18:539–543.

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.

SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev.* 1996;76(2):371-423.

SCHWAB, M.E.; BARTHOLDI, D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Rev. Physiol.* 1996;76(2):319-370.

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, *EFDportes*, 2012;17(171):15-21.

SIU, P.M.; PISTILLI, E.E.; ALWAYS, S.E. Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. *J Appl Physiol* 2008;05(6):1695-705.

SMITH, L. R.; CHAMBERS, H. G.; LIEBER, R. L. Reduced satellite cell population may lead to contractures in children with cerebral palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 2013;55(3):264-70.

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.

SOUZA, R.S.; PINHAL, M.A.S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde* 2011;36(1):48-54.

SVERZUT, A.C.M.; CHIMELLI, L. O papel das células satélites nas respostas adaptativas do tecido muscular esqueléticos. *Rev Fisioter Univ São Paulo.* 1999;6(2):132-139.

TAGLIAFERRI, F.; COMPAGNONE, C.; KORSIC, M.; SERVADEI, F.; KRAUS, J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochirurgica* 2006;148(3):255-68.

TEIVE, H.A.G.; ZONTA, M.; KUMAGAI, Y. Tratamento da espasticidade: uma atualização. *Arq. Neuro-Psiquiatr* 1998;56(4):852-858.

TEIXEIRA, M.J., FONOFF, E.T. Tratamento cirúrgico da espasticidade. São Paulo. *Rev Med* 2004;83(1-2):17-27.

TEIXEIRA-SALMELA, L.F.; OLIVEIRA, E.S.G.; SANTANA, E.G.S.; RESENDE, G.P. Fortalecimento muscular e condicionamento físico em hemiplégicos. *Acta Fisiátrica* 2000;7(3):108-18.

THOMAS NE, WILLIAMS DRR. Inflammatory factors, physical activity, and physical fitness in young people. *Scand J Med Sci Sports* 2008;18:543-56.

TILTON, AH. Therapeutic Interventions for Tone Abnormalities in Cerebral Palsy. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2006;3(2):217–224.

TORRES, B. B. J.; SILVA, C. M. O.; ALMEIDA, Á. E. R. F.; CALDEIRA, F. M. C.; GOMES, M. G.; ALVES, E. G. L.; SILVA, S. J.; MELO, E. G. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* , 2010;62(1):92-99.

UPADHYAY, A.; CHOMPOO, J.; KISHIMOTO, W.; MAKISE, T.; TAWATA, S. HIV-1 integrase and neuraminidase inhibitors from *Alpinia zerumbet*. *J Agric Food Chem.* 2011; 13;59(7): 2857-62.

VENOJÄRVI M, KVIST M, JOZSA L, KALIMO H, HÄNNINEN O, ATALAY M. Skeletal muscle HSP expression in Response to Immobilization and Training. *Int J Sports Med* 2007;28:281-6.

VICTÓRIO, C.P.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S; LAGE, C.L.S. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2009;19(3):697-701.

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;137:242-254.

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

WILLOUGHBY, D.S.; NELSON, M.J. Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(8):1262-9.

XAVIER-Filho, L.; RODRIGUES, S.; SEIXAS, S. Extração e Purificação do Óleo Essencial de *Alpinia speciosa* Schum. *In: Relatório Final. Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia.* Instituto de Tecnologia e Pesquisa – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2004.

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO
MÚSCULO ESPÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL
PÓS-LESÃO MEDULAR TRATADAS COM ÓLEO
ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet***

**ANALYSIS of HISTOPATHOLOGIC CHANGES of SPASTIC
MUSCLE in EXPERIMENTAL MODEL post SPINAL CORD
INJURY TREATED with ESSENTIAL OIL of *Alpinia zerumbet***

Janaína Farias Cândido¹, ²Claúdia Alcaraz Zini, ³Elina Bastos Camarao,
⁴Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, ⁵Edna Aragão Farias Cândido.

¹Universidade Tiradentes, Programa de Mestrado em Saúde e Ambiente (PSA),
Aracaju SE, Brasil, e-mail: jana.fc@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química,
Departamento de Química Inorgânica, Porto Alegre RS, Brasil, e-mail:
cazini@iq.ufrgs.br

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

⁴Universidade Tiradentes, Programa de Mestrado e Doutorado em Saúde e
Ambiente (PSA), Aracaju SE, Brasil, e-mail: ricardo_luiz@unit.br.

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

RESUMO - O traumatismo raquimedular (TRM) é uma lesão que compromete o sistema nervoso central provocando uma redução ou perda da função motora e/ou sensitiva do indivíduo. A *Alpinia zerumbet* apresenta ação de relaxamento muscular pela modulação dos canais de cálcio. O objetivo deste estudo é analisar o efeito da aplicação tópica do óleo essencial de *A. zerumbet* (OEAz) sobre as alterações

histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental de lesão medular. Para tanto, foram utilizados 30 ratos Wistar, sendo realizada lesão medular (em T9 ou T10) utilizando estereotáxico adaptado em 24 deles e laminectomia nos seis restantes. Posteriormente, os animais foram divididos em 5 grupos (n=6): lesão medular, subdivididos em grupo sem tratamento e tratados com OEAZ (0,05ml/2Kg), fisioterapia e a combinação de ambos, além do grupo laminectomia. O período de tratamento foi de 30 dias. Foi realizada a avaliação comportamental de acordo com o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Após 30 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os músculos gastrocnêmios foram removidos e analisados em microscopia de luz. Os dados obtidos foram analisados com o teste Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn, considerando significativo $p < 0,05$. O estudo demonstrou que entre os grupos tratados apenas a terapia combinada de OEaz associado a Fisioterapia apresentou melhora significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo Lesão na avaliação do comportamento neurológico funcional. E na avaliação das miofibrilas e espaço de endomísio os resultados foram adequados semelhantes ao grupo sadio (Laminectomia).

Palavra-chave: *Alpinia*; espasticidade muscular; óleos essenciais.

ABSTRACT - The spinal cord injury (SCI) is an injury that affects the central nervous system causing a reduction or loss of motor function and/or sensory function to the individual. The *Alpinia zerumbet* shows some action muscle relaxation by modulating calcium channels. The objective of this study is to analyze the effect of topical application of essential oil *A. zerumbet* (OEAz) on the spastic muscle histopathologic changes in an experimental model of spinal cord injury. For this purpose, 30 Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, young adults of both sexes) were used. The animals underwent standardized spinal cord injury. There were 5 groups of 6 animals each: The first group was the Laminectomy group, 2nd was the Injury group, Physiotherapy group the 3rd, 4th the OEAz group at a dose of 0.05 ml / 2 kg and 5th group was the OEAz and Physiotherapy, all of them were treated for 30 days. Performance evaluation was performed according to the protocol described by Basso, Beattie and Bresnahan (BBB). After 30 days, the animals were sacrificed in a CO₂ chamber and the gastrocnemius muscles fibers were extracted and examined. Data were analyzed with the Kruskal-Wallis test and post-test of Dunn, considering a significant result of ($p < 0.05$). The study showed that the groups treated with a combination therapy of OEAz

associated with physical therapy showed significant improvement ($p < 0.01$) compared with the group of functional neurobehavioural injury. The study also showed that the separate treatment of physiotherapy and OEAz not adequately benefited from the development of the activity of myofibrils. Physiotherapy alone allowed the development of collagen on perimysium and OEAz also alone despite a better response behavior on the neurological assessment showed increased endomysial space, consistent with atrophy. However, the combination therapy of OEAz associated with physical therapy had myofibrils neurobehavioral functional and appropriate, similar to the healthy group (laminectomy)

Key word: *Alpinia*; spasticity muscle; essential oil

INTRODUÇÃO

O trauma raquimedular (TRM) é uma lesão neurológica incapacitante, com grande impacto na sociedade e o que representa um problema de saúde pública. Afeta principalmente a população de adultos jovens, entre os 16 e 30 anos de idade, do sexo masculino, sendo a região cervical e a transição toracolombar os segmentos mais atingidos, e muitas vezes resultam em morte ou deficiência motora.

No Brasil, estima-se uma incidência de dez mil novos casos por ano, principalmente devido ao trauma como as lesões por armas de fogo, por meios violentos e os acidentes de trânsito (COSTA et al., 2014; FERREIRA et al., 2012; SANTIAGO et al., 2012). Em 2010 foram, aproximadamente 96.000 novos casos de lesão medular com sequelas motoras (SILVA et al., 2012).

Foran et al. (2005) afirmam que diante a lesão medular, os músculos se apresentam espásticos com alterações estrutural, com isso, um rico modelo de plasticidade muscular é inconsistente diante das transformações devido as estimulações crônicas ou desuso desses músculos. Trócoli e Furtado (2008) demonstraram que o treinamento de força muscular não influencia, de forma negativa ou positiva, o tônus muscular.

A partir dessas alterações estruturais o presente artigo tem como objetivo Analisar as alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental pós-lesão medular tratadas com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo pré-clínico, experimental e comportamental que foi realizado no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural e no Laboratório de Estudos Biológicos e Produtos Naturais do Instituto de tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes.

Material Vegetal

As amostras do OEAz à 33% foram doadas pela empresa Hebron Farmacêutica, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Ltda, com sede em Pernambuco. Esse medicamento foi confeccionado à partir da coleta de folhas verdes transportadas em carro climatizado, tendo seu óleo essencial extraído por arraste a vapor (hidrodestilação) e seu veículo um óleo vegetal.

Foi realizada a análise cromatográfica no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com objetivo de identificar a composição do produto. Utilizado o 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 injector 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.

Animais

Foram utilizados 30 ratos da raça Wistar, adultos, de ambos os sexos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Que apresentassem peso entre 250 a 300 gramas, agrupados 3 ratos em cada gaiola de propriopileno, em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Ao final de cada experimento os animais são sacrificados e, posteriormente, incinerados no Biotério da Universidade Tiradentes. O estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA de nº 020513 (ANEXO 2) da referida universidade.

Procedimento cirúrgico

Foi utilizado um modelo experimental adaptado de acordo com o estudo 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 pesados e administrado o relaxante muscular Cloridrato de Ketamina a 10% (95mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal, onde a cada 100 gramas do rato foi administrado 0,01 tanto do anestésico quanto do relaxante muscular com duração do efeito por duas horas.

Os animais após anestesiados foram colocados em decúbito ventral com exposição do dorso para a realização da tricotomia (região torácica) e em seguida submetido à assepsia com a solução de polivinil pirrolidona iodo.

Após a assepsia foi realizada uma incisão vertical de aproximadamente 5cm de comprimento, sobre os processos espinhosos, expondo tecido subcutâneo, com afastamento subperiosteal da musculatura paravertebral para a exposição da coluna vertebral. Desta incisão foi localizada, por meio da palpação da última costela, as vértebras T9 e T10 para assim realizar a laminectomia, expondo a medula espinhal recoberta pela dura-máter intacta. Com a exposição do canal medular foi realizado o trauma mecânico utilizando o aparelho Estereotático adaptado confeccionado pelos pesquisadores composto de uma haste fina de ponta romba (01mm²) com peso acoplado de 70g por 05 minutos. Logo após a compressão medular a musculatura e a pele do rato foi suturado com fio 4.0 poliamida monofilamento não absorvível.

Nos cuidados pós-operatório foi realizado a antibioticoterapia profilática com pentabiol reforçado intraperitoneal em dose única (0,1mg/100g), e acomodação de três animais por gaiolas, estas contendo com água e ração, em ambiente climatizado.

Grupos experimentais e doses

Foram realizados 5 grupos com 6 animais cada, totalizando 30 animais foram submetidos a tratamento por cinco dias na semana durante 30 dias. A dose será de 0,05ml/2Kg do fitofármaco OEAz (na diluição de 33% do OEAz em 67% de óleo vegetal). Nos grupos tratados com Fisioterapia foi realizada as mobilizações passivas de flexo-extensão de joelho e tornozelo direito e seu controle apenas a movimentação diária normal sem nenhum estímulo, em ambas as patas. Os grupos foram divididos em:

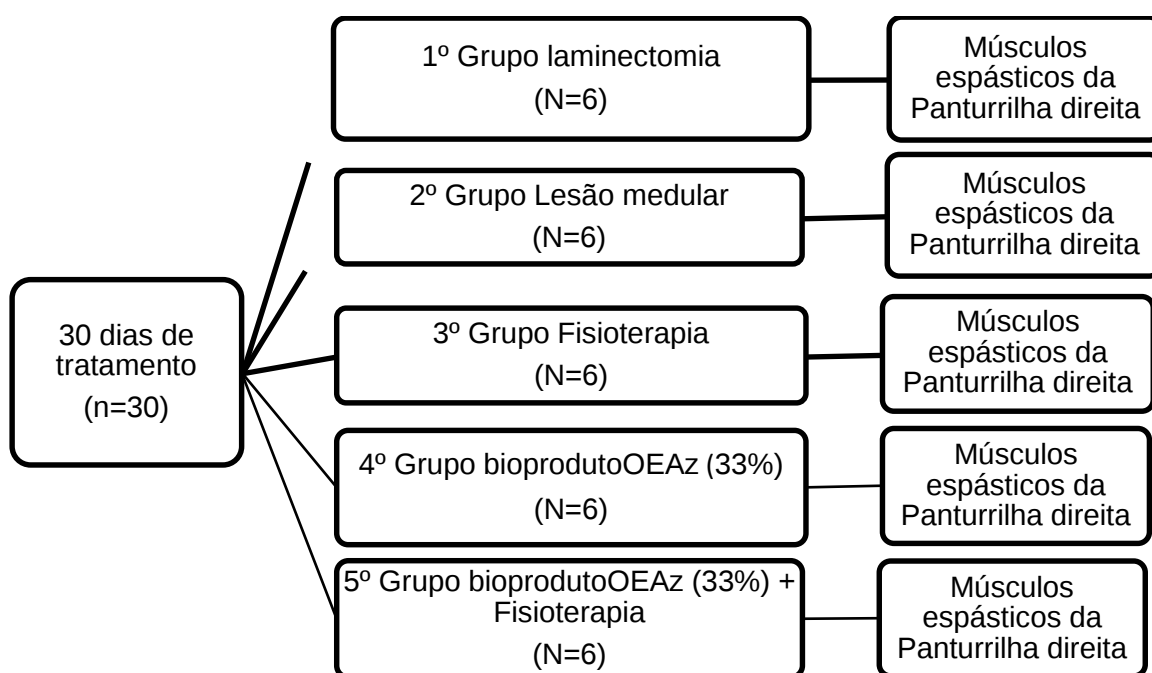


Figura 2: Organograma dos grupos experimentais, o 1º grupo - laminectomia; 2º grupo - Lesão medular; 3º grupo – Fisioterapia, 4º grupo - BioproductoOEAz (33%); e 5º grupo - BioproductoOEAz (33%) associado ao tratamento de Fisioterapia

O tratamento teve início após 15 dias de lesão medular compressiva somando 45 dias da lesão, uma vez que os animais foram tratados por 30 dias. Desta forma, os músculos paréticos se encontram com espasticidade e contratura muscular, pois em projeto piloto foi percebido que em 14 dias os animais já tinham saído na fase flácida e estariam na fase de espasticidade, andando com limitação parcial demonstrando contraturas na movimentação passiva das articulações do joelho e tornozelo.

Protocolo de tratamento

Os animais não tratados: Laminectomia e Lesão; e os grupos tratados: BioproductoOEAz, Fisioterapia + BioproductoOEAz associado a Fisioterapia iniciaram o tratamento diário a partir do 15º dia de pós operatório totalizando 30 dias de tratamento totalizando 45 após a lesão medular. Durante todas as visitas diárias os animais receberam massagens abdominais com o objetivo de esvaziar a bexiga e a defecção, visto que a lesão medular pode causar transtornos vesicais e esfinterianos favorecendo o bem estar fisiológico do animal.

Protocolo de avaliação

Foram realizados testes funcionais para avaliação comportamental e neurológica em oito avaliações no 1º, 3º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 45º dia. A partir dessas avaliações foi possível observar o comprometimento funcional e comportamental na lesão aguda, subaguda e crônica. As avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador para um resultado mais fidedigno.

Foi realizada a avaliação comportamental através do protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).

Durante a avaliação do BBB foram avaliados os seguintes escores: movimentos das patas, coordenação, firmeza, comprometimento do tronco. E como subitens desses o: movimento do membro posterior, posição do tronco, abdome, posição da pata, caminhada, posição predominante da pata, instabilidade do corpo e rabo. O BBB avalia desde a ausência total de movimentos (escore 0) até o movimento normal (escore 21). Para esta avaliação o rato é colocado em um campo aberto e observado de dois a quatro minutos (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995; SEDÝ, 2008).

Análise Histológica

Para caracterização histopatológica, os ratos foram eutanasiados, retirados os músculos gastrocnêmio e colocados no formal a 10%. Na confecção das laminas foi realizado o processo de desidratação e clareamento em álcool e xilol, cada processo com duração de uma hora. Após este procedimento foi realizada a inclusão do material na parafina e em seguida, a formação dos blocos com o tecido. O corte do material embocado foi realizado no micrótomo na espessura de 5 µm. As laminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para a análise histológica, segundo Albuquerque Júnior et al. (2009).

Nas lamínas foram analisadas as seguintes variáveis: miofibrilas, endomísio, perimísio, epimísio e feixe muscular. E fotografadas com microscópio (Olympus, BX51, Tokio, Japão) equipado com uma câmera digital (Olympus, DP71, Tokio, Japão). As imagens foram adquiridas com resolução de 2040 x 1536 pixels e salvas em arquivo no formato TIF.

Análise estatística

O programa estatístico utilizado foi GraphPad Prism 6.01. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade das variáveis estudadas. Já as análises de comparações múltiplas utilizaram a análise de variância simples por Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn. Foi considerado $p < 0.05$.

RESULTADO

O OEAz analisado cromatograficamente pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul apresentou monoterpenos hidrocarbonetos (40,32%), prevalecendo γ -terpineno (11,63%) e p-cimeno (5,85%); monoterpenos oxigenados (50,94%), prevalecendo terpeno-4-ol (23,23%) e 1,8 cineol (21,77%); sesquiterpenos oxigenados (3,52%) e sesquiterpenos hidrocarbonetos (2,8%). Esses resultados estão condizentes com Santos et al. (2011) quando analisou o OEAz da mesma procedência e encontrou as áreas referentes ao composto terpeno-4-ol (37,62%); 1,8 cineol (17,58%); γ -cymene (11,77%) e p-cymene (10,67%).

TABELA 1: Lista de compostos identificada pela Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC/MS) do óleo essencial isolado das folhas e ramos do bioproduto OEAz.

No.	Compound name	Lit LTPRI	DB5 LTPRI	%
Monoterpene hydrocarbons				40.32
1	cyclene ^a	926	919	0.01
2	3-thujene ^a	930	923	3.75
3	tricyclo[2.2.1.0 ^{2,6}]heptane, 1,3,3-trimethyl- ^b	927	929	2.56
4	2,4-thujadiene ^c	946	940	0.15
5	camphene ^a	953	945	0.51
6	4(10)-thujene ^a	975	969	3.12
7	β -pinene ^a	979	974	2.69
8	β -myrcene ^a	991	988	0.74
9	4-carene ^e	1004	997	0.01

10	α -phellandrene ^a	1002	1004	0.83
11	α -terpinene ^a	1015	1014	3.83
12	<i>p</i>-cymene ^a	1024	1023	5.85
13	limonene ^a	1029	1028	2.87
14	γ-terpinene ^a	1059	1057	11.63
15	terpinolene ^a	1088	1083	1.71
16	1,3,8- <i>p</i> -menthatriene ^a	1108	1111	0.06

Oxygenated monoterpenes

50.94

17	eucalyptol ^a (or 1,8-cineol)	1031	1032	21.77
18	linalool ^a	1095	1099	0.91
19	(<i>Z</i>)-2-menthen-1-ol ^a	1121	1123	0.49
20	(<i>E</i>)-pinocarveol ^a	1139	1138	0.12
21	(<i>E</i>)-2-menthen-1-ol ^a	1140	1141	0.28
22	camphor ^a	1146	1144	0.10
23	β -terpineol ^a	1063	1068	0.08
24	thujone ^e	1116	1116	0.08
25	pinocarvone ^a	1164	1159	0.03
26	borneol ^a	1169	1170	0.40
27	terpinen-4-ol ^f	1182	1181	23.23
28	<i>p</i> -cymenene ^a	1091	1089	0.28
29	α -terpineol ^g	1192	1193	2.14
30	(<i>E</i>)-piperitol ^a	1208	1207	0.22
31	(<i>E</i>)- <i>p</i> -mentha-1(7),8-dien-2-ol ^a	1227	1229	0.03
32	cuminaldehyde ^a	1241	1242	0.02
33	piperitone oxide ^h	1253	1255	0.11
34	thymol ^a	1290	1291	0.18
35	<i>p</i> -cymen-2-ol ^a	1299	1297	0.48

Sesquiterpene hydrocarbons

2,80

36	ylangene ⁱ	1372	1365	0.04
37	α -copaene ^a	1376	1372	0.01
38	β -elemene ^a	1389	1375	0.16
39	caryophyllene ^a	1417	1415	1.31
40	α -bergamotene ^j	1436	1430	0.13
41	aristolene ^l	1429	1438	0.11
42	β -cadinene ^m	1472	1475	0.01
43	γ -selinene ⁿ	1479	1480	0.15
44	γ -muurolene ^a	1478	1485	0.13
45	β -selinene ^a	1489	1488	0.03
46	α -selinene ^a	1498	1492	0.07
47	(<i>Z</i>)- β -guaiene ^a	1492	1495	0.01
48	β -bisabolene ^a	1505	1506	0.02
49	γ -cadinene ^a	1513	1509	0.46
50	<u>α-guaiene ^a</u>	1509	1519	0.15

<i>Oxygenated Sesquiterpenes</i>				3.52
51	(<i>E</i>)-nerolidol ^a	1564	1560	0.17
52	carotol ^a	1594	1599	0.17
53	selina-6-en-4-ol ^o	1624	1620	0.02
54	isolongifolan-8-ol ^o	1515	1500	0.26
55	caryophyllene oxide ^a	1582	1578	2.18
56	12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene, 1,5,5,8-tetramethyl- ^a	1606	1606	0.19
	tetracyclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol, 4,4-dimethyl- ^a	1652	1652	0.54
<i>Total chromatographic área of tentatively identified compounds</i>				97.58

As referência da biblioteca foram: ^aAdams 2000; ^bDamjanovic Skala et al., 2006; ^cKonig, Joulain et al., 2006; ^eJavidnia Miri et al., 2004; ^fHamm Bleton et al., 2004; ^gYu Liao et al., 2007; ^hBader, Flamini, et al., 2003; ⁱShatar S., 2005; ^jÖzel Göğüs et al., 2006; ^lNogueira Bittrich et al., 2001; ^mZoghbi Andrade et al., 2003; ⁿCourtois, Paine, et al., 2009; ^oCardeal, da Silva, et al., 2006.

Em relação as características musculares, o grupo Laminectomia, se encontravam com células angulosas com bastante núcleos laterais, pequenos espaços em perimísio. No grupo Lesão as células estão arredondadas e polimórficas com poucos núcleos laterais; presença de colágeno em perimísio, poucos núcleos laterais, além de células com aspecto de degeneração hidrópica. No grupo Fisioterapia as células se apresentam angulosas, arredondadas e polimórficas, com poucos núcleos laterais e células x ao redor das miofibrilas, além de grandes espaços em endomísio e perimísio e presença de colágeno em perimísio. No grupo OEAz foi observado células angulosas com bastante núcleos laterais e grande espaço em endomísio e perimísio. Já o grupo OEAz + Fisioterapia as células são angulosas com bastante núcleos laterais e colágeno em perimísio (FIGURA 2 e 3).

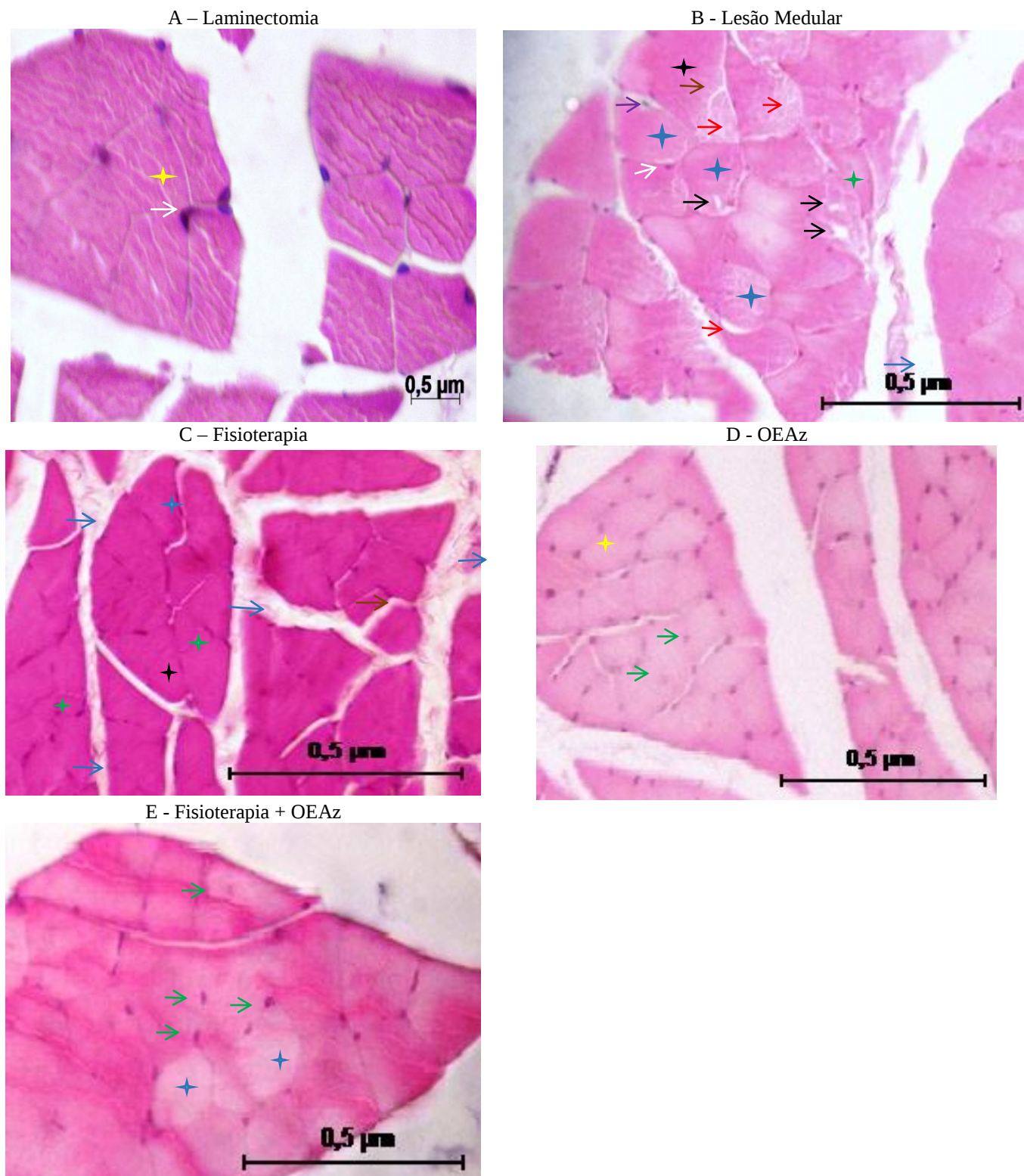
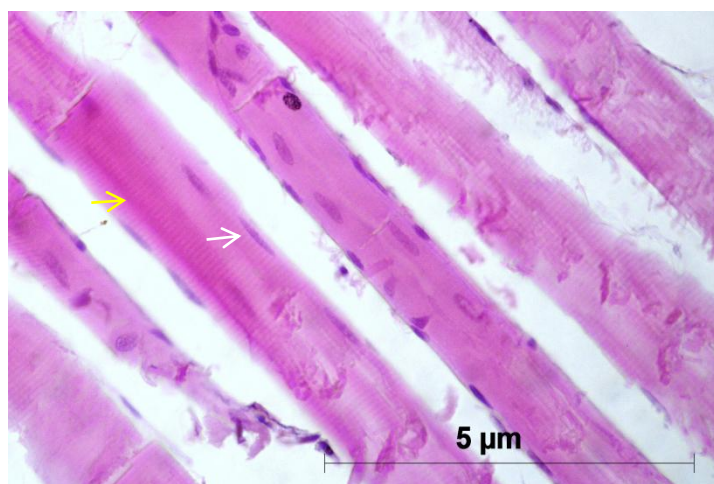
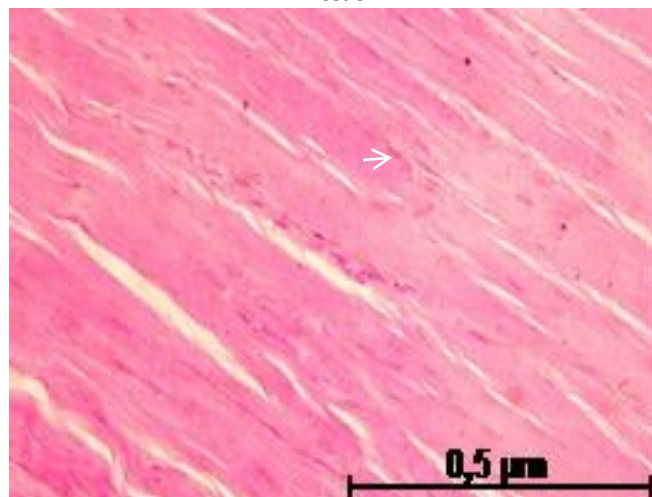


Figura 3: Corte transversal de miofibrilas. A – Laminectomia; B – Lesão medular; C- Fisioterapia; D – OEAz; e E – Fisioterapia + OEAz. Foram encontradas: células poligonais (estrela amarela); células hipertróficas (estrela preta) Célula atrofica (estrela verde); célula arredondada (estrela azul); núcleo periférico (seta branca); núcleo central (seta verde); macrófago (seta lilás); degeneração hidrópica (seta vermelha); degeneração vacuolar (seta preta); splitting (seta marron); colágeno em perimísio (seta azul).

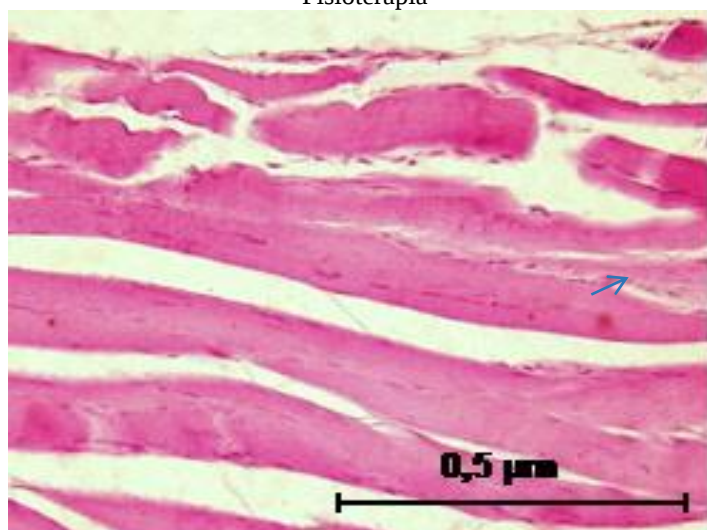
Laminectomia



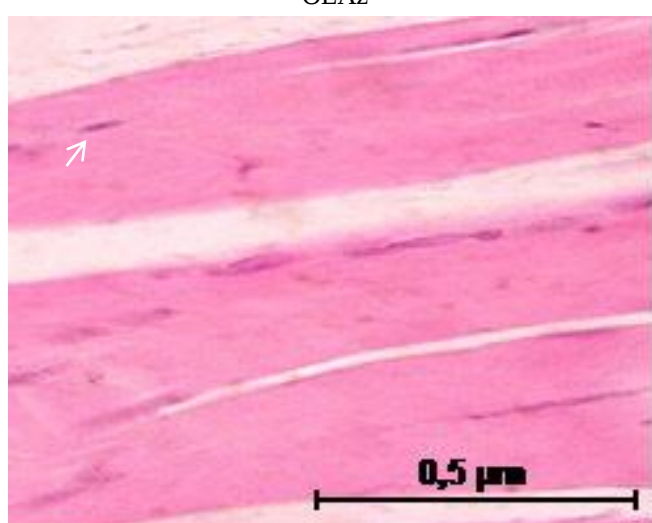
Lesão



Fisioterapia



OEAz



Fisioterapia + OEAz

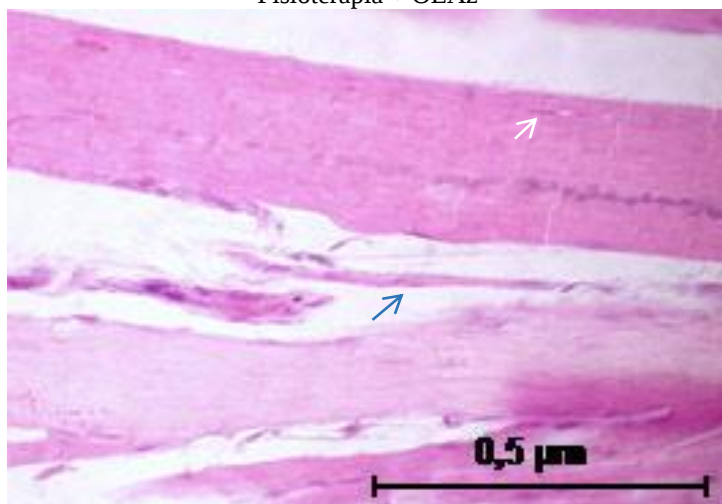


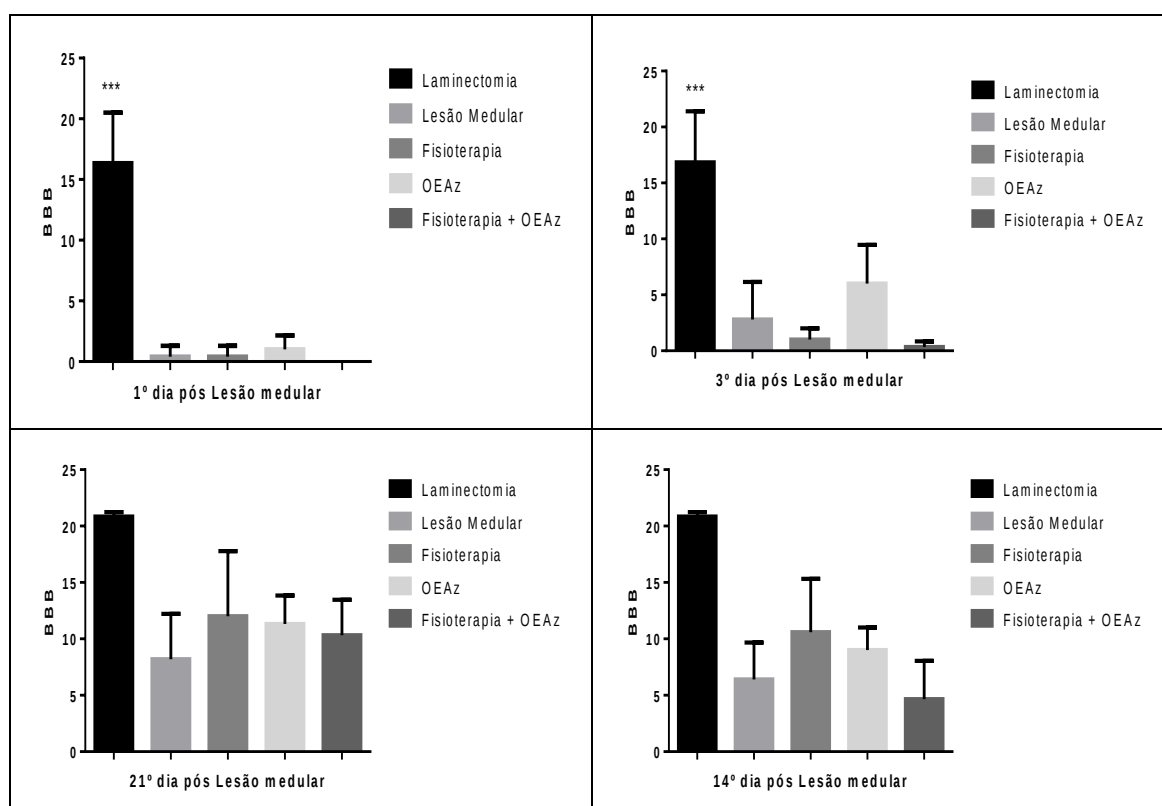
Figura 4: Corte longitudinal de miofibrilas. A – Laminectomia; B – Lesão medular; C- Fisioterapia; D – OEAz; e E – Fisioterapia + OEAz. Foram encontradas: núcleo periférico (seta branca); miofibrilas alinhadas (seta amarela) colágeno entre as fibras (seta azul).

Nos resultados obtidos também se avaliou comportamento neurológico funcional e testes neurológicos. Os animais tratados ou não obtiveram seus escores com leitura de examinador cego utilizando-se de filmes desses testes comportamentais, tais como avaliação neurológica e capacidade motora e testes de posicionamento proprioceptivo e tátil e sensibilidade dolorosa.

Na figura 4 foi apresentado a avaliação comportamentais neurológica pelo teste BBB. Os animais dos distintos grupos apresentaram-se da seguinte forma.

O melhor resultado foi para o grupo Laminectomia, demonstrando que apenas houve acesso do canal medular sem causar lesão de medula; e escore com média 16,33 em decorrência dos animais ainda estarem se reabilitando da própria cirurgia.

Os grupos tratados e o grupo Lesão quando comparados ao Laminectomia, permaneceram sem melhora significativa até o último dia de tratamento. Os grupos Fisioterapia e OEAz se apresentaram sem melhora significativa também até o último dia de tratamento. Já o grupo Fisioterapia + OEAz apresentou melhora significativa em 45 dias quando comparado ao grupo Lesão.



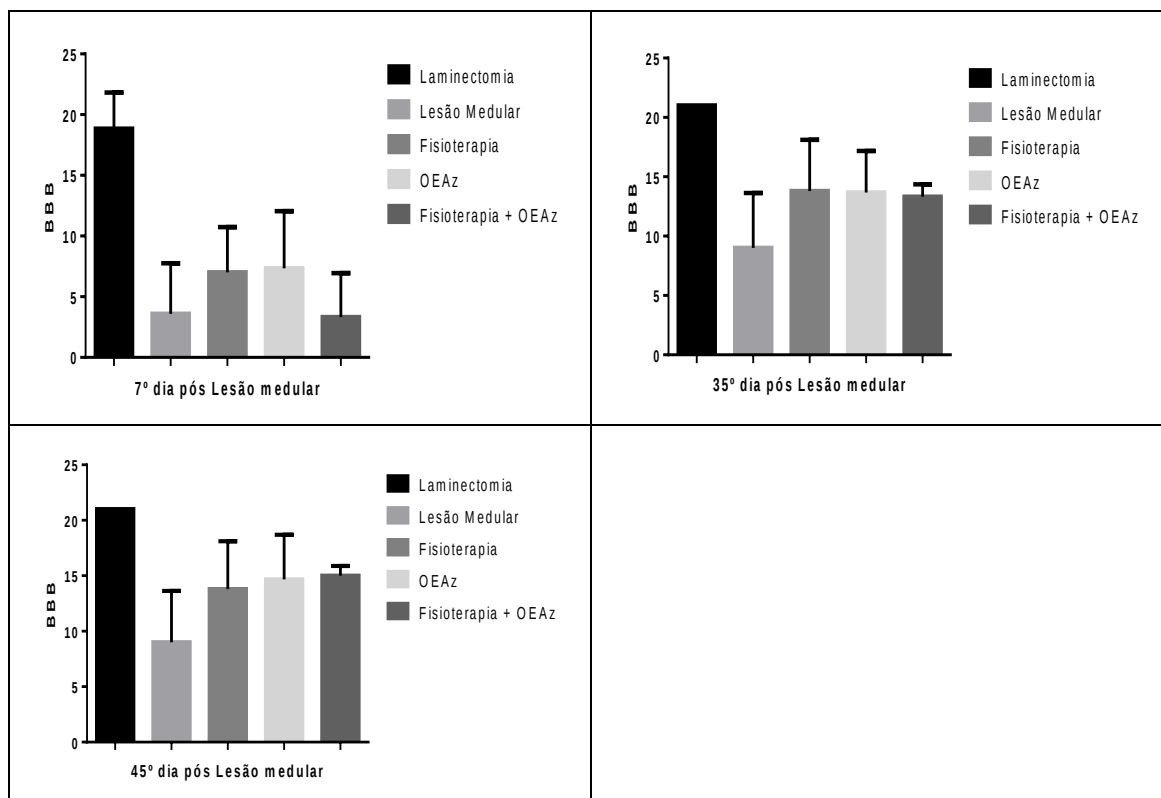


Figura 5: Avaliação neurológica funcional de acordo com Basso, Beattie e Bresnahan (1995) de ratos Wistar, submetidos a lesão traumática da medula espinal durante 45 dias de lesão, e tratados ou não por 30 dias com Fisioterapia e/ou OEAz. $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$.

Na figura 5 foi mensurado o tamanho das miofibrilas. A comparação dos grupos Lesão, OEAz e Fisioterapia com Laminectomia não demonstrou melhora pois apresentou diferença significativa; com diferença significativa para o grupo Lesão e Fisioterapia de $p<0,01$ e no grupo OEAz de $p<0,001$. O grupo OEAz + Fisioterapia se apresentou igual ao grupo Laminectomia, demonstrando boa recuperação. Assim como o grupo OEAz + Fisioterapia apresentou-se melhor quando comparado ao grupo Fisioterapia, com diferença significativa de $p<0,01$, e OEAz ($p<0,001$).

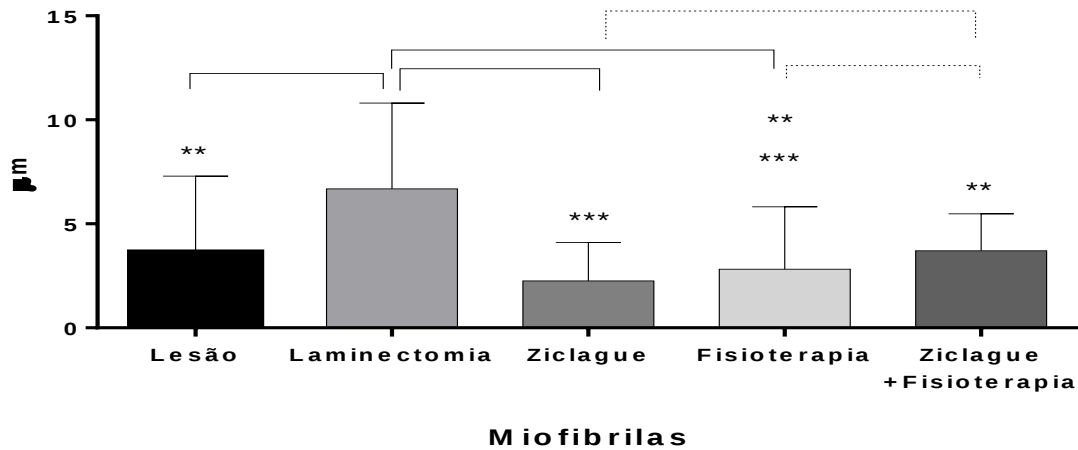


Figura 6: Comparação do tamanho de miofibrila ente grupo tratado e não tratado em lesão medular experimental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de kruskal-Wallis com pós-teste Dunn.

Na figura 6 foi mensurado o endomísio. Esse envoltório reflete a distância entre as miofibrilas. Quando observado a comparação do grupo de Laminectomia, com os grupos Lesão e OEAz foi encontrado diferença significativa de $p < 0,001$ demonstrando aumento na distância entre o endomísio maior que o normal. O grupo Fisioterapia e OEAz + Fisioterapia não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Laminectomia. Entretanto, quando comparado o tamanho do endomísio entre os grupos tratados com o OEAz, o grupo OEAz ($p < 0,001$) e Fisioterapia ($p < 0,01$) apresentaram aumento significativa de distância do endomísio em relação ao grupo OEAz + Fisioterapia.

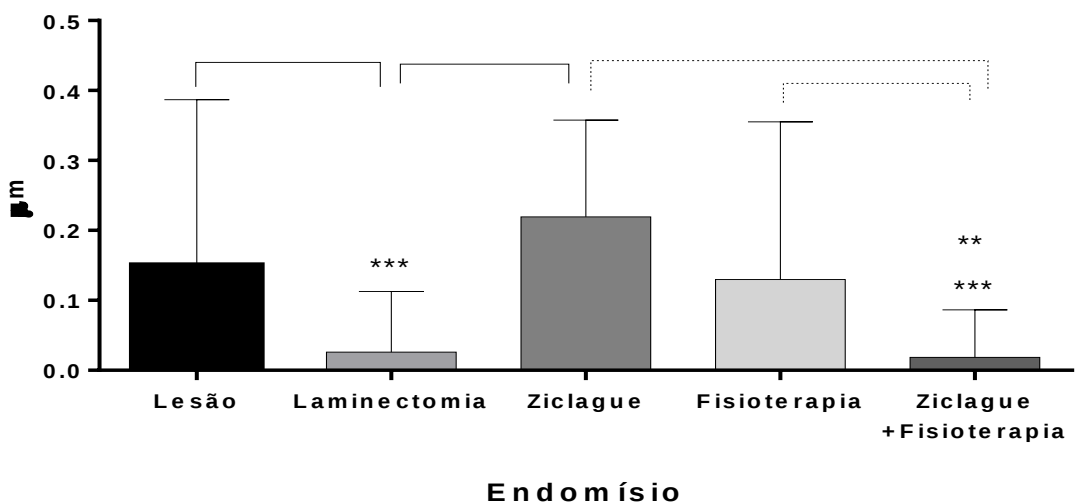


Figura 7: Comparação do tamanho do endomísio ente grupo tratado e não tratado em

lesão medular experimental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$. Teste de kruskal-Wallis com pós-teste Dunn.

Na figura 7 foi observado a comparação da distância do perimísio entre os grupos tratados e não tratados, não havendo alteração significativa entre esses grupos e o grupo sadio - Laminectomia.

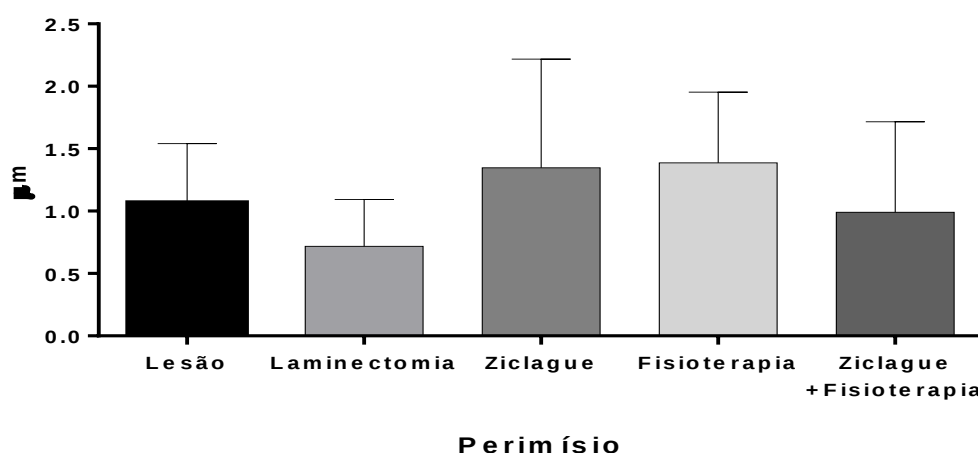


Figura 8: Comparação do tamanho do perimísio entre grupo tratado e não tratado em lesão medular experimental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$. Teste de kruskal-Wallis com pós-teste Dunn.

DISCUSSÃO

A padronização para lesão medular exige o cuidado em relação ao nível da lesão. Ainda não havendo padronização universal, utilizou-se neste estudo um modelo visando a lesão compressiva parcial moderada, como consequência, a paresia e não a paralisia. O modelo também se apresenta favorável em relação ao trofismo muscular, diretamente dependente da capacidade funcional residual do animal, causa - em nível medular - espasticidade, sem debilitar e comprometer a alimentação e independência do animal evitando co-morbidade. Tais orientações e cuidados foram prescritos por Torres et al. (2010).

Segundo Silva et al. (2012), os lesados medulares apresentam em seu quadro clínico problemas vesico urinários, incontinência intestinal e úlceras de pressão, porém o mais comum é a espasticidade. A espasticidade torna o músculo hiperativo, devido ao excesso de excitação neuronal, também conhecido como reflexo de estiramento dependente de hiperatividade. Para Bennett et al. (1999), Bennett et al. (2004), Li et al. (2004), Norton et al. (2008), Murray et al. (2010) e Rank et al. (2011), os motoneurônios da medula espinhal de ratos, após transecção medular, se

apresentam alterados. Essa alteração produz excitabilidade das vias reflexas espinhais durante períodos prolongados de despolarização, causando espasticidade após duas semanas após lesão. Para Bennett et al. (1999; 2004) essas alterações são decorrentes ao aumento do volume de sódio e cálcio, advindo dos canais do tipo L. Nessas condições a ausência do sódio e cálcio também justifica a fase de choque medular em decorrência da inativação dos mesmos (LI; BENNETT, 2003).

No presente estudo, até 14 dias de lesão medular, como padroniza Bennet al. (2004) para instalação de espasticidade, os animais não foram submetidos a nenhuma terapêutica aplicada. Durante e após esse período o padrão de paraparesia evidenciou alteração na capacidade funcional como esperado, e provavelmente devido a espasticidade. Esse comportamento motor alterado foi verificado segundo os escores do BBB desde os primeiros dias após a lesão.

Após período de 14 dias de instalação de espasticidade, os músculos ficaram hiperativos por regulação inadequada dos canais de cálcio do tipo L, segundo Smith et al. (2009), induzido pelo aumento de cálcio no retículo sarcoplasmático de forma crônica. Essa alteração, do ponto de vista fisiológico, causa lesões extensas e alterações nas propriedades contráteis dos músculos (GORDON et al., 2000).

Para Grounds; Torrisi, 2004 e Marques et al., 2008 a lesão tecidual apresenta características próprias determinadas por atividade celular quando a regeneração se encontra em processo avançados. Essas alterações são caracterizadas por citoplasma basófilo, núcleo centralizado e escasso infiltrado inflamatório ao seu redor. Característica também encontrada no grupo Lesão (FIGURA 3).

No grupo Fisioterapia foi observado na Figura 3 a presença de macrófago em miofibrilas. Essa característica de atividade fagocitária já vem sendo evidente desde 1994, quando Cantini et al. vinculam a presença de macrófago na regulação mitótica das células satélites que estavam quiescentes e se tornaram ativas. Na mesma figura também foi observado degeneração hidrópica, para Sverzut; Chimelli (1999) a lesão tecidual é caracterizada por rompimento de miofilamento, anormalidade mitocondrial, descontinuidade sarcolemal e desequilíbrio hidro-eletrolítico ativando complementos C5b-9 desencadeadores dos mecanismos de lise celular, além de quimiotáticos para macrófago no local da lesão muscular.

Ainda em relação a hiperatividade dos músculos espásticos causadores de lesões musculares encontradas no grupo Lesão deste estudo, em seguida será

explanado as alterações nos canais de cálcio em processo fisiológico, para evidenciar a dimensão de suas consequências.

O aumento dos níveis de Ca^{2+} livre no sarcoplasma e o não tamponamento pelo retículo sarcoplasmático ocorrerá maior ativação de enzimas proteolíticas dependente de Ca^{2+} (ALDERTON; STEINHARDT, 2000).

Diante do processo fisiológico já existe naturalmente uma alteração em decorrência do aumento na permeabilidade celular, diante de atividade excessiva de exigência muscular. Esse comportamento gera um aumento no influxo de cálcio no sarcoplasma muscular, incentivando inflamações e ciclos de degeneração e regeneração dessas células. A sinalização celular alterada pode estar relacionada a esse mecanismo de mionecrose (RANDO, 2001), resultado observado na figura 3.

Nesse contexto o estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio celular, devido ao aumento das reações de oxigênio ou diminuição na atividade dos sistemas antioxidantes. Para Zoppi et al. (2006) o aumento da intensidade de esforço físico funciona como indutor nos níveis de estresse oxidativo, associado com aumento menos eminente da atividade das enzimas antioxidantes.

O aumento do estresse oxidativo é potencializado pela participação de fatores inflamatórios liberados por neutrófilos, macrófagos e citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (WHITEHEAD, 2006). Esses eventos provavelmente justificam também os resultados da avaliação neurológica funcional dos grupos Lesão e Fisioterapia (FIGURA 6), uma vez que esses grupos não apresentam bons resultados em sua melhora funcional. O grupo Fisioterapia se mostrou melhor que o grupo Lesão.

Foi visto na avaliação neurológica comportamental deste estudo entre os grupos tratados, apenas o grupo Fisioterapia obteve melhora em seus escores, porém com pouca variância e não significativo quando comparado ao grupo Lesão em oposição ao grupo Laminectomia, após o início do tratamento. Já o grupo OEAz apresentou resultados semelhantes ao grupo Laminectomia após 21 dias de tratamento. Entretanto, quando o OEAz foi associado a Fisioterapia, resultado observado na figura 3, houve melhora significativa a partir de 35 e 45 dias, ou seja após 20 e 30 dias de tratamento, com comportamento semelhante ao grupo Laminectomia.

Essa melhora, justificado por Ferreira et al (2012), relata efetividade da fisioterapia motora na reabilitação de ratos com lesão medular em todas as fases.

Proporcionando maior independência funcional e melhora da qualidade de vida. Essas alterações fazem os músculos espásticos, tratados com fisioterapia, melhorem. Porém, com resultados divergentes ao grupo de músculos sadios (Laminectomia), apesar de Murphy (1999) e Peterson (2000) relatarem a movimentação passiva, de forma repetida, resultando em mudanças nas alterações das propriedades mecânicas dos músculos, impedindo expressão modificada da cadeia pesada de miosina nos músculos I e IIa.

Em relação as miofibrilas (FIGURA 4) entre os grupos tratados, ratos tratados com OEAz + Fisioterapia obtiveram melhoras. Tanto o grupo Fisioterapia quanto o grupo OEAz apresentaram tamanho de fibras diferentes do grupo Laminectomia e OEAz + Fisioterapia. Esses achados também foram observados quando se mensurou o espaço do endomísio evidenciando os grupos Lesão, Fisioterapia e OEAz apresentaram espaços maiores quando comparados ao grupo Laminectomia e OEAz + Fisioterapia (FIGURA 5). Evidenciando provável atrofia muscular. Porém, o espaço do perimísio não apresentou diferença entre nenhum dos grupos analisados. No entanto quando verificado a avaliação qualitativa pelas imagens foi constatado no grupo Lesão como no grupo fisioterapia a presença de colágeno em perimísio, em comparação aos grupos OEAz e OEAz + Fisioterapia (FIGURA 2).

Para Fry et al. (2004) e Mohaghenghi et al. (2007) os ventres de músculos gastrocnêmios de crianças com paralisia cerebral apresentam diminuição de massa muscular em dois terços, em comparação as crianças sadias. Essa informação também é mencionada por Lieber et al. (2003) onde relatam que os músculos espásticos apresentam seus feixes musculares reduzidos em 40%. Esses espaços entre endomísio e fibras, segundo Ito et al. (1996) e Booth et al. (2001) são mais amplos quando há aumento de tecido conjuntivo extracelular com aumento da densidade de colágeno nos músculos espásticos. Ainda segundo Smith et al. (2011), a espasticidade de paráliticos cerebrais causa tensão passiva patológica produzindo contraturas e alterações da matriz extracelular. As evidências apontam uma possível promoção da redução no comprimento e volume do ventre muscular, na espasticidade, além do aumento do número de fibras do tipo I, redução de sarcômeros em série e acréscimo de tecido conjuntivo extracelular nos músculos espásticos (DIAS 2013).

No contexto das variáveis pesquisadas o grupo OEAz + Fisioterapia apresentou os melhores resultados. Estes por sua vez podem ser justificados por

Candido; Xavier-Filho (2012), ao relatar crianças com paralisia cerebral submetidas ao tratamento com o OEAz + Fisioterapia obtiveram melhoras funcionais de forma significativas em 30 dias de tratamento. Já a melhora da espasticidade pode ser justificada pela modulação dos canais de cálcio do tipo L ao serem modulados pelo OEAz nas doses de 25 e 250µL de forma dose-dependente, identificados por Santos et al. (2011). Esses Ca^{2+} modulados pelo OEAz são os mesmos alterados, encontrados por Li; Bennet (2004) e Smith et al (2009), nas lesões dos motoneurônios e músculos espásticos decorrentes de lesão medular em ratos.

O provável mecanismo de modulação mais elucidado nos estudos de Dowling et al. (2003), ao evidenciar a sarcalumenina, menor proteína ligada ao Ca^{2+} reduzida, influenciando a calsequestrina, proteína responsável pela estocagem de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático de músculos esqueléticos. Dessa forma os moduladores de canais de Ca^{2+} do tipo L inativam os receptores rianodínicos impedindo a saída de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (ISLAM et al., 2002; ROSSI; DIRKSEN, 2006).

Com a modulação adequada do quantitativo de Ca^{2+} associado aos exercícios passivos provavelmente promoverá proteção antioxidante das células musculares com homeostase protéica das fibras musculares. Essa ação promove efeitos terapêuticos na proteção contra atrofia muscular e degeneração (VENOJÄRVI et al., 2007 THOMAS; WILLIAMS, 2008).

5.CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que o tratamento separado da Fisioterapia ou OEAz não beneficiou adequadamente o desenvolvimento de atividade das miofibrilas para evitar a atrofia muscular em músculos espásticos de ratos com lesão medular. A Fisioterapia ainda permitiu o desenvolvimento de colágeno em perimísio, e o OEAz apesar de melhor resposta na avaliação neurológica comportamental apresentou espaço aumentado de endomísio, compatível com atrofia. Porém, a terapia combinada de OEAz associado a Fisioterapia apresentou miofibrilas, comportamento neurológico funcional e espaço de endomísio adequados, semelhantes ao grupo sadio (Laminectomia).

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. London: Allured Pub. Corp. 2007; 804.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, S. A. L.; PIRES, A. J.; REIS, P. F.; LIMA, O. S.; RIBEIRO, G. M. A.; CARDOSO, C. J. 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.
- ALDERTON, J.M.; STEINHARDT, R.A. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes *trend card*, 2000;10(6): 268-272.
- BASSO, D.M.; BEATTIR, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field test in rats. *J Neurotrauma* 1995; 12: 1-21.
- BENNETT, D.J., GORASSINI, M., FOUAD, K., SANELLI, L., HAN, Y., CHENG, J. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 16, 69–84, 1999.
- 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.
- BOOTH, C.M.; CORTINA-BORJA, M.J.; THEOLOGIS, T.N. Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. *Dev Med Child Neurol.* 2001;43(5):314-20.
- 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): 110-5.
- COSTA, V. S. P.; OLIVEIRA, L. D.; OYAMA, C. M.; AZUMA, C. S.; MELO, M. R. A. C.; COSTA FILHO, R. M. Perfil dos Pacientes com Trauma Raquimedular Atendidos pelas Clínicas Escolas de Londrina. RM / UNOPAR. *Cient., Ciênc. Biol. Saúde* 2010;12(2):39-44.

DIAS, C.P.; ONZI, E.S.; GOULART, N.B.A.; VAZ, M.A. Adaptações morfológicas musculares na espasticidade: revisão da literatura. Artigo de Revisão. *Scientia Medica* (Porto Alegre) 2013; 23(2). 102-107.

Dowling, P.; Doran, P.; Ohlendieck, K. Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427-deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy. *Biochemical Journal* 2003; 1-35.

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.

FORAN, J.R.H.; STEINMAN, S.; BARASH, I.; CHAMBERS, H.G.; LIEBER, R.L. Structural and mechanical alterations in spastic skeletal muscle. *Developmental medicine and child neurology* 2005. v.47, n.10, 713-7.

FRY, N.R., GOUGH, M.; SHORTLAND, A.P. Three-dimensional realisation of muscle morphology and architecture using ultrasound. *Gait Posture*. 2004;20(2):177-82.

GORDON AMH; HOMSHER E; REGNIER M. Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiological Reviews* 2000, 80(2): 853-924p.

GROUND MD, TORRISI J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J.* 2004; 18: 676-82.

ISLAM, M.N., NARAYANAN, B., OCHS, R.S. A mechanism for both capacitative Ca^{2+} entry and excitation-contraction couple Ca^{2+} release by the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle cells. *Exp Biol Med.* 2002. 227(6), 425-431.

ITO J, ARAKI A, TANAKA H. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. *Brain Dev.* 1996;18(4):299-303.

LI, Y. E.; BENNETT, D.J. Correntes de sódio e cálcio persistentes causar potenciais planalto em motoneurônios espinhais de ratos crônicas. *J. Neurophysiol.* 2003;90:857-869. doi: 10,1152 / jn.00236. 2003.

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

MARQUES MJ, MACHADO RV, MINATEL E, SANTO NETO H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in mdx sternomastoid, diafragm and tibialis anterior. *Muscle Nerve*. 2008; 37(1): 61-7.

MOHAGHENGI, A.A.; KHAN, T.; MEADOWS, T.H. Differences in gastrocnemius muscle architecture between the paretic and non-paretic legs in children with hemiplegic cerebral palsy. *Clin Biomech* 2007;22(6):718-24.

MURPHY, M.B.; EGELHOFF, T.T. Biochemical characterization of a Dictyostelium myosin II heavy-chain phosphatase that promotes filament assembly. *Eur J Biochem* 1999; 264: 582-90.

MURRAY, K.C., STEPHENS, M.J., BALLOU, E.W., HECKMAN, C.J., BENNETT, D.J. Motoneuron excitability and muscle spasms are regulated by 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor activity. *J. Neurophysiol.* 2010;105(2):731–738..

NORTON, J.A., BENNETT, D.J., KNASH, M.E., MURRAY, K.C., GORASSINI, M.A. Changes in sensory-evoked synaptic activation of motoneurons after spinal cord injury in man. *Brain*. 2008;131:1478–1491.

RANDO, T.A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001.24:1575-1594.

RANK, M.M.,MURRAY, K.C., STEPHENS,M.J., D'AMICO, J., GORASSINI,M.A., BENNETT, D.J. Adrenergic receptors modulate motoneuron excitability, sensory synaptic transmission and muscle spasms after chronic spinal cord injury. *J. Neurophysiol.* 2011;105:410–422.

RECK-PETERSON, S. L.; PROVANCE, D. W. JR.; MOOSEKER, M. S.; MERCER, J. A. Class V myosins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000. 1496, 36-51.

ROSSI, A.E., DIRKSEN, R.T. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve* 2006; 33: 715-731.

SANTIAGO, L. M. M.; BARBOSA, L. C. S., GUERRA, R. O.; MELO, F. R. L. V. Aspectos sociodemográficos e clínicos de homens com lesão medular traumática em um centro urbano do nordeste brasileiro. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde* 2012;37(3):137-142.

SANTOS, B. A.; ROMAN-CAMPOS, D.; CARVALHO, M. S.; MIRANDA, F. M.; CARNEIRO, D. C.; CAVALCANTE, P. H.; CÂNDIDO, E. A.; XAVIER-FILHO, L.; CRUZ, J. S.; GONDIM, A. N. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca^{2+} current blockade. *Phytomedicine* 2011;18:539–543.

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.; CHAMBERS H.G.; LIEBER R.L. Reduced satellite cell population may lead to contractures in children with cerebral palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2013; 55(3): 264-70.

SMITH L.R.; PONTÉN E.V.A.; YVETTE H.; WARD S.R; CHAMBERS H.G.; SHANKAR S.; LIEBER R.L. Novel transcriptional profile in wrist muscles from cerebral palsy patients. *BMC Medical Genomics* 2009; 2(44): 1-16.

SMITH, L. R.; CHAMBERS, H. G.; LIEBER, R. L. Reduced satellite cell population may lead to contractures in children with cerebral palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 2013;55(3):264-70.

SVERZUT, A.C.M.; CHIMELLI, L. O papel das células satélites nas respostas adaptativas do tecido muscular esqueléticos. *Rev Fisioter Univ São Paulo*. 1999;6(2):132-139.

THOMAS NE, WILLIAMS DRR. Inflammatory factors, physical activity, and physical fitness in young people. *Scand J Med Sci Sports* 2008;18:543-56.

TORRES, B. B. J.; SILVA, C. M. O.; ALMEIDA, Á. E. R. F.; CALDEIRA, F. M. C.; GOMES, M. G.; ALVES, E. G. L.; SILVA, S. J.; MELO, E. G. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotático modificado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* , 2010;62(1):92-99.

TRÓCOLI, T.O.; FURTADO, C. Fortalecimento muscular em hemiparéticos crônicos e sua influência no desempenho funcional. *Rev Neurocienc* 2009;17(4):336-41.

VENOJÄRVI M, KVIST M, JOZSA L, KALIMO H, HÄNNINEN O, ATALAY M. Skeletal muscle HSP expression in Response to Immobilization and Training. *Int J Sports Med* 2007;28:281-6.

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

WHITEHEAD, N.; YEUNG, E.W.; ALLEN, D.G. Muscle damage in mdx dystrophic mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006; 33: 657-662.

XAVIER-Filho, L.; RODRIGUES, S.; SEIXAS, S. Extração e Purificação do Óleo Essencial de *Alpinia speciosa* Schum. In: *Relatório Final. Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia*. Instituto de Tecnologia e Pesquisa – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2004.

ZOPPI, C.C.; HOHL, R.; SILVA, F.C.; LAZARIM, F.L.; NETO, J.M.F.A.; STANCANNELI, M.; MACEDO, D.V. Vitamin C and E Supplementation Effects in Professional Soccer Players Under Regular Training. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2006: 37-44.

ANEXO 1

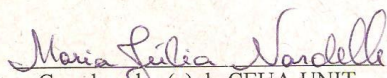
Primeira aprovação do comite de ética (CEUA).



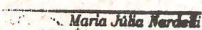
UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto, “Análise do envolvimento do proteoglicano decorin nas alterações morfohistológica de tecido musculares espásticos em modelo experimental pós-lesão medular induzida, tratadas com óleo essencial da Alpinia Zerumbet”, processo nº 020513, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pelo pesquisador Edna Aragão Farias Cândido, onde recebeu o parecer de Reencaminhamento aos autores, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 27 de junho de 2013.


Coordenador (a) da CEUA-UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT


Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS Nº 300 B.FAROLÂNDIA
CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE: (79)3218 2266
F AX: (79) 3218 21 00

ANEXO 2

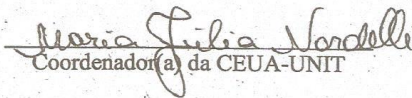
Segunda aprovação do comite de ética (CEUA).



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

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto de pesquisa, “Análise das alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental pós-lesão medular tratadas com possível fitofármaco “Ziclague”, processo nº 081114, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pela pesquisadora **Edna Aragão Farias Cândido**, onde recebeu o parecer de **Aprovado**, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 11 de dezembro de 2014.


Coordenador(a) da CEUA-UNIT

ANEXO 3: Avaliação do Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).

Animal tipo: _____ Avaliado em: ____/____/____ Grupo: _____ Tempo: _____

Movimento dos membros						Posição do tronco			Caminhando																								
E-2 Quadril		E-3 Joelho		E-7 Tornozelo					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		RI/RE no contato inicial-14 RI/RE no balanço -16 Paralelas no contato inicial -15,16 Paralelas no balanço-17										
E	D	E	D	E	D	Lado	Centrado	Apoio	Abdome	Colocação da pata 8-10						F- 8 e 14		Apoio dorsal		Apoio plantar		Coordenação		Mobilidade 1º dedo		Posição predominante da pata				Instabilidade de tronco		Rabo	
O	O	O	O	O	O	E	D		E	D	Apoiado	E	D	E	D	E	D	E	D	A	E	D	Contato inicial	Balanço (elevação) da pata		20 Sim		19 Abaixado					
L	L	L	L	L	L				Paralelo								A	A	A	A	O	A	A	E	D	E	D	21 Não		20,21 Elevado			
E	E	E	E	E	E				Alto								O	O	O	O	F	O	O	RI	RI	RI	RI						
																		F	F	F	F	C	F	F	RE	RE	RE	RE					
																		C	C	C	C		C	C	Para	P	P	P					

A= Ausente, O= Ocasionalmente L= Limitado, 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/ Cauda para baixo ou às vezes

20-Instabilidade do tronco/ Cauda constantemente elevada
21-Constante estabilidade do tronco e cauda elevada

ANEXO 4: Submissão do artigo

[ISP] Agradecimento pela submissão



Prof. Dr. Carlos Henrique Medeiros de Souza (interscienceplace@gmail.com)

[Adicionar aos contatos](#) 13/02/2015

Para: janaina Farias

janaina Farias,

Agradecemos a submissão do trabalho "ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO MÚSCULO ESPÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL PÓS-LESÃO MEDULAR TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet*." para a revista InterSciencePlace.

Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão:

<http://www.interscienceplace.org/interscienceplace/author/submission/434>

Login: janaina

Em caso de dúvidas, entre em contato via e-mail.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de compartilhar seu trabalho.

Prof. Dr. Carlos Henrique Medeiros de Souza
InterSciencePlace

© 2015 Microsoft Termos Privacidade e cookies Desenvolvedores Português (Brasil)



Revista Científica Internacional. ISSN: 1679-9844



CAPA	SOBRE	PÁGINA DO USUÁRIO	PESQUISA	ATUAL	ANTERIORES	NOTÍCIAS	EDITORIAL	NORMAS	OPEN JOURNAL SYSTEMS
Capa > Usuário > Autor > Submissões > #434 > Resumo									Ajuda do sistema
#434 Sinopse									USUÁRIO Logado como: janaina Perfil Sair do sistema
Submissão									AUTOR Submissões Ativo (1) Arquivo (0) Nova submissão
RESUMO AVALIAÇÃO EDIÇÃO									NOTIFICAÇÕES Visualizar (5 nova(s)) Gerenciar
Autores Janaina Farias Cândido									CONTEÚDO DA REVISTA
Título ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO MÚSCULO ESPÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL PÓS-LESÃO MEDULAR TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DA <i>Alpinia zerumbet</i> .									Pesquisa
Documento original 434-1490-1-SM-DOCX 2015-02-13									Todos
Docs. sup. Nenhum(a) INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR									Pesquisar
Submetido por janaina Farias									Procurar
Data de submissão fevereiro 13, 2015 - 10:02									Por Edição Por Autor Por título
Seção Artigos									
Editor Nenhum(a) designado(a)									
Situação									
Situação Aguardando designação									
Iniciado 2015-02-13									
Última alteração 2015-02-13									
Metadados da submissão									

Metadados da submissão

[EDITAR METADADOS](#)

Autores

Nome Janaina Farias Cândido 
Instituição/Afiliação Universidade Tiradentes
País —
Resumo da Biografia —
Contato principal para correspondência.

Título e Resumo

Título ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO MÚSCULO ESPÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL PÓS-LESÃO MEDULAR TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet*.

Resumo O traumatismo raquimedular (TRM) é uma lesão que compromete o sistema nervoso central provocando uma redução ou perda da função motora e/ou sensitiva do indivíduo. A *Alpinia zerumbet* apresenta ação de relaxamento muscular pela modulação dos canais de cálcio. O objetivo deste estudo é analisar o efeito da aplicação tópica do óleo essencial de *A. zerumbet* (OEAz) sobre as alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental de lesão medular. Para tanto, foram utilizados 30 ratos Wistar, sendo realizada lesão medular (em T9 ou T10) utilizando estereotático adaptado em 24 deles e laminectomia nos seis restantes. Posteriormente, os animais foram divididos em 5 grupos (n=6): lesão medular, subdivididos em grupo sem tratamento e tratados com OEAZ (0,05ml/2Kg), fisioterapia e a combinação de ambos, além do grupo laminectomia. O período de tratamento foi de 30 dias. Foi realizada a avaliação comportamental de acordo com o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Após 30 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os músculos gastrocnêmios foram removidos e analisados em microscopia de luz. Os dados obtidos foram analisados com o teste Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn, considerando significativo p<0.05. O estudo demonstrou que entre os grupos tratados apenas a terapia combinada de OEAz associado a Fisioterapia apresentou melhora significativa (p<0.01) em relação ao grupo Lesão na avaliação do comportamento neurológico funcional. E na avaliação das miofibrilas e espaço de endomísio os resultados foram adequados semelhantes ao grupo sadio (Laminectomia).

Procurar

- [Por Edição](#)
- [Por Autor](#)
- [Por título](#)

TAMANHO DE FONTE



INFORMAÇÕES

- [Para leitores](#)
- [Para Autores](#)
- [Para Bibliotecários](#)