

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO FITOFÁRMACO ZICLAGUE® SOBRE A
ESPASTICIDADE DECORRENTE DE TRAUMATISMO
RAQUIMEDULAR EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA**

MAYANNA MACHADO FREITAS

Aracaju
Fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO FITOFÁRMACO ZICLAGUE® SOBRE A
ESPASTICIDADE DECORRENTE DE TRAUMATISMO
RAQUIMEDULAR EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA**

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.

MAYANNA MACHADO FREITAS

Orientadores

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, D.Sc.

Edna Aragão Farias Cândido, D.Sc.

Co-orientadora

Ana Margarida de Oliveira Martins Guerreiro Calado, D.Sc.

Aracaju
Fevereiro – 2016

Freitas, Mayanna Machado
F862e Efeitos do fitofármaco Ziclague® sobre a espasticidade decorrente de traumatismo raquimedular experimentalmente induzida. / Mayanna Machado Freitas; orientação [de] Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, Prof^a. Dr^a Edna Aragão Farias Cândido, Prof^a. Dr^a. Ana Margarida de Oliveira Martins Guerreiro Calado – Aracaju: UNIT, 2016.
112 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2016.
Inclui bibliografia.

1.Alpinia. 2. Espasticidade muscular. 3. Compressão da medula espinhal. I. Cândido, Edna Aragão Farias. (orient.). II. Calado, Ana Margarida de Oliveira Martins Guerreiro. (co-orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 504: 614

**EFEITOS DO FITOFÁRMACO ZICLAGUE® SOBRE A ESPASTICIDADE
DECORRENTE DE TRAUMATISMO RAQUIMEDULAR EXPERIMENTALMENTE
INDUZIDA**

Mayanna Machado Freitas

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.

Aprovada por:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior
Orientador

Prof.^a Dr.^a. Edna Aragão Farias Cândido
Orientadora

Prof.^a Dr.^a. Ana Margarida de Oliveira Martins Guerreiro Calado
Co-orientadora

Prof.^a Dr.^a. Luciana Maria de Hollanda
Universidade Tiradentes

Prof.^a Dr.^a. Margarete Zanardo Gomes
Universidade Tiradentes

Prof.^a Dr.^a. Lorena Almeida Melo
Universidade Tiradentes (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico este Mestrado aos meus pais, Vera Lucia e Luiz Marcelo, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Após o longo período de muita dedicação, o sonho se concretiza e hoje sou Mestre. É evidente que não caminhei sozinha e por isso devo muitos agradecimentos.

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela realização deste sonho, por me proteger, guiar e dar forças para enfrentar as batalhas durante essa caminhada. É a Ele que dirijo minha maior gratidão, transmitindo-me segurança necessária para chegar até aqui.

Aos meus pais, Vera Lucia e Luiz Marcelo, que me revestiram de amor, carinho e dedicação. Abriram a porta do meu futuro com o estudo. Trabalharam, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros em todos os momentos. Palavras não conseguem definir o amor incondicional que tenho por vocês.

Amo vocês!

À minha irmã Maysa, pela cumplicidade, ajuda, paciência e compreensão, acreditando sempre no meu potencial e sucesso. Há momentos de cumplicidade que somente uma irmã pode entender e é por isso que agradeço a meus pais por você ter nascido e ser um pedaço de mim. Que essa nossa sintonia se multiplique e que a cumplicidade partilhada nunca deixe de ser uma constante. Estarei ao teu lado em todos os momentos e lembre-se sempre: para uma verdadeira irmã, qualquer distância é já ali ao lado. Te amo demais!

Ao meu amor Rogério, ofereço um agradecimento mais do que especial por ter surgido literalmente nas nuvens e desde então, estar comigo nos momentos de alegrias, suportando meus momentos de ausência, fraqueza, estresse e angústias. Agradeço por todo apoio, amor, cumplicidade, carinho, respeito, paciência e por tornar minha vida cada dia mais feliz. "...É só pensar em você que muda o dia, minha alegria dá pra ver, não dá pra esconder...". Amo você! Aos teus familiares, por terem me acolhido com muito carinho, confiança, além de todo incentivo para obtenção dessa grande conquista.

Aos meus avós, presente (vó Trifina) e ausentes (vó Maria, vô Paulo e vô Zé) por serem exemplos de superação, dedicação, determinação e mostrando sempre a simplicidade da vida. Amo vocês!

Aos meus tios e tias, primos e primas, que próximos ou distantes, mostraram carinho, afeto e persistência, sempre torcendo e acreditando na minha vitória. Meus sinceros agradecimentos!

Aos mestres, em especial a minha professora orientadora Dr^a Edna Aragão, pela grande oportunidade de aprendizado na iniciação científica como forma de experiência prévia para ingresso no mestrado. Agradeço também pelo estímulo, atenção, confiança em mim depositada e por compartilhar seu conhecimento durante esse trajeto. À minha segunda orientadora, Dr^a Ana Margarida Calado e família, por me acolherem de forma tão calorosa,

pela prontidão em mostrar o caminho, pela disponibilidade e gentileza com que sempre se pautou, pela segurança que transmitiu e pelo imenso e exemplar profissionalismo que demonstrou possuir. Aos demais mestres que formam o programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, que com sabedoria, contribuíram para minha formação acadêmica, pessoal e profissional.

Agradeço aos meus amigos por estarem presentes nos momentos cruciais, em especial Mosara (confidente, compreensiva, especial e essencial em minha vida), Tâmara (amiga de infância e de sempre), Loreнна (pela bela amizade em todos os sentidos), Shirley e Manu (minhas irmãs do coração, agradeço pela amizade cultivada desde o curso de Fisioterapia), Cynthia Passos e Agilson (pela amizade fiel e por mostrarem o verdadeiro valor da amizade, mesmo não estando sempre próximos), Silvia Carmen e Edson Wagner (casal que admiro e sou grata por todo apoio, conselhos, amizade e companheirismo), Edmara (por toda trajetória e compartilhamento de sonhos em busca do sucesso), Keyciane e Jennifer (amigas da Enfermagem para vida, sou grata por toda transmissão de otimismo), Gabi Dantas (ela sabe o quanto gosto dela), Dani Souza (pessoa incrível a qual tive oportunidade de conhecer desde a iniciação científica. Obrigada por toda atenção e ajuda durante esse percurso), amigos “Gulas” (a garantia das melhores risadas resume-se nesse grupo). Aos colegas de turma do Mestrado, que por diversas vezes chegamos a nos sentir derrotados, com medo do desconhecido. Porém, quando menos se esperava, brotava uma palavra amiga, um sorriso franco, contribuindo de uma forma especial para meu sucesso. Em especial, meus agradecimentos à Eliane (amiga fundamental durante toda a trajetória do Mestrado e essencial na minha tomada de decisão para realização do doutorado. De acordo com a classificação internacional de amizade, é considerada amiga A[∞]), Tessy (pela amizade, companheirismo e compartilhamento de pensamentos e risadas), Bia, Fernanda e Cleberson (por dividirmos alegrias e tristezas durante essa longa jornada), Cecília (por ser sempre prestativa e gentil em todos os momentos) e Tays (pelo crescimento a partir das dificuldades enfrentadas nas disciplinas da Pós-Graduação).

Às alunas de Iniciação Científica e do TCC (Jéssica, Rafaela, Edilaine, Mayara, Francielly e Gabrielle), a quem sou imensamente grata, pela amizade, cumplicidade, companheirismo, por serem minhas doses de ânimo e perseverança diárias. Muito obrigada por terem assumido responsabilidades durante meu período de ausência com paciência e dedicação, principalmente nos momentos em que tudo parecia perdido. Tenho muito orgulho de ter tido uma equipe tão unida e eficiente como vocês. Cada uma de vocês moram no meu coração! Meus agradecimentos também à Janaína, Igor Henrique, Antônio Araújo, Genisson, Carol e Luan, por toda disponibilidade.

A todos que fazem parte do LBPN e LMBE pelo carinho, apoio, por me receberem tão bem, me ajudarem e participarem deste trabalho. Ao LHAP da Universidade de Trás-os-Montes e

Alto Douro, por disponibilizar seu laboratório para realização dos experimentos e pelo apoio teórico que muito contribuiu para meu aprendizado. Aos funcionários do ITP, em especial Filipe Santos, pela ajuda incansável sem medir esforços. Aos funcionários do biotério, pelo apoio técnico excepcional. Não poderia deixar de agradecer aos meus ratos *Wistar*, que tornaram possível a realização desse projeto. À CAPES/FAPITEC, pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para meu sucesso, pela pessoa que hoje sou, por todos momentos e oportunidades que vocês me proporcionaram. Seguirei com a certeza de que obstáculos virão, mas tenho Deus sempre comigo. Valeu a pena os dias de angústia, de cansaço e exaustão vividos nessa correria em busca de um sonho que hoje se concretiza. Levarei comigo a certeza de que se quero sou capaz, de que tenho força e vontade para transformar o mundo. Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vii
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS OU PRESSUPOSTOS DO PROJETO	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
2.3 Hipóteses	18
3 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Tecido muscular e Fisiologia da Contração	19
3.2 Lesão muscular	21
3.3 Tecido conjuntivo	22
3.4 Traumatismo raquimedular	25
3.5 Espasticidade.....	27
3.6 Modelos murinos	31
3.7 Testes comportamentais	32
3.8 Tratamentos	33
3.8.1 Tratamento alopático para a espasticidade	33
3.8.2 Fisioterapia	34
3.8.3 Fitoterapia	34
3.8.3.1 <i>Alpinia zerumbet</i>	35
4 CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Desenho da pesquisa	38
4.2 Local da pesquisa	38
4.3 Submissão do estudo à Comissão de Ética no Uso de Animais	38

4.4	Fitofármaco	38
4.5	Animais	39
4.6	Procedimento cirúrgico	40
4.7	Grupos experimentais	40
4.8	Protocolo de tratamento	41
4.9	Protocolo de avaliação	41
4.10	Análise histomorfológica	42
4.11	Análise estatística	43
5	REFERÊNCIAS	44
6	ARTIGO 1	54
7	ARTIGO 2	75
8	CONCLUSÃO	108
	ANEXO I	109
	ANEXO II	110
	ANEXO III	111
	ANEXO IV	112

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. ORGANIZAÇÃO DAS FASES EXPERIMENTAIS COM RATOS INDUZIDOS À LESÃO MEDULAR, N= 72 ANIMAIS.	41
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
<i>A. zerumbet</i>	<i>Alpinia zerumbet</i>
Ca ²⁺	Cálcio
BBB	Basso, Beattie, Bresnahan
CEUA	Comissão de Ética de Uso Animal
CPM	Cadeia Pesada da Miosina

DHP	Diidripiridina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOU	Diário Oficial da União
EAM	Escala de Ashworth modificada
ESF	Estratégia de Saúde da Família
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
ITP	Instituto de Tecnologia e Pesquisa
LBPN	Laboratório de Estudos Biológicos e Produtos Naturais
LMBE	Laboratório de morfologia e Biologia Estrutural
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
CPM	Cadeia pesada da Miosina
OEAz	Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Paralisia cerebral
RyR1	Proteína receptora de Rianodina
SE	Sergipe
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Síndrome piramidal
SUS	Sistema Único de Saúde
TCE	Traumatismo Crânio encefálico
TGF β	Fator de crescimento transformante β
TRM	Traumatismo Raquimedular
UNIT	Universidade Tiradentes

TÍTULO DO PROJETO – Efeitos do fitofármaco Ziclague® sobre a espasticidade decorrente de traumatismo raquimedular experimentalmente induzida.

ÁREA DO CONHECIMENTO - Ciências Biológicas.

SUBÁREA DO CONHECIMENTO – Morfologia.

ESPECIALIDADE – Histologia.

RESUMO

O traumatismo raquimedular é responsável por diversos tipos de sequelas que alteram a motricidade. As complicações desse traumatismo causam espasticidade, sendo esta a alteração muscular que mais compromete a funcionalidade do indivíduo. O entendimento sobre o mecanismo de ação dessa hipertonía gera novas pesquisas com o Ziclague®, e este medicamento, derivado do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, modula os canais de cálcio do tipo L. Assim, objetivou-se avaliar as alterações musculares em modelo murino de Traumatismo Raquimedular após tratamentos agudo e subagudo com Ziclague®. A pesquisa foi experimental com ratos (*Wistar*) divididos em seis grupos de seis animais, tratados durante 3 e 14 dias, totalizando 72 animais divididos em grupo Ziclague® Tópico (uso tópico), Ziclague Oral (gavagem), Baclofeno (uso tópico), Controle (submetido à lesão medular sem tratamento), Laminectomia e Sadio (sem serem submetidos a procedimento cirúrgico). Foram realizadas análises comportamentais e avaliação histomorfológica dos músculos gastrocnêmios espásticos. Foi aplicado ANOVA ONE e TWO WAY com pós teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. O grupo Ziclague Oral mostrou melhores escores de Basso Beattie e Bresnahan em relação aos grupos Baclofeno ($p < 0,01$) em 7 dias e Controle ($p < 0,01$) em 14 dias. Os escores da *Escala de Ashworth* mostraram que em 14 dias, os tônus musculares dos grupos tratados apresentaram diferença significativa em relação aos grupos Sadio e Laminectomia ($p < 0,001$). Na descrição qualitativa, os grupos Controle e Baclofeno apresentaram tecido conjuntivo espesso, enquanto que os grupos Sadio, Laminectomia, Ziclague® Tópico e Ziclague Oral obtiveram tecido conjuntivo delgado. Os grupos Sadio, Ziclague® Tópico e Ziclague Oral apresentaram colágeno frouxo e os grupos Controle e Baclofeno, colágeno denso. Em relação a organização de colágeno, apenas o grupo Controle obteve tecido conjuntivo não modelado. Na análise histomorfológica, o grupo Ziclague Oral apresentou melhores resultados nas variáveis largura de feixes musculares e miofibrilas, seguido do grupo Ziclague® Tópico. Para a largura de endomísio o Ziclague Oral, Ziclague® Tópico e Baclofeno apresentaram menor largura em relação ao Controle; e na invaginação do colágeno o Ziclague Oral foi menor em relação ao Controle. No tipo de colágeno, Baclofeno (55,56% e 61,11%) e Ziclague® Tópico (50 e 72,22%) apresentaram moderadamente colágenos tipo I e III. Já o Ziclague Oral (61,11% e 66,67%) apresentou escasso e moderado colágenos tipo I e III, respectivamente. Assim, provavelmente o Ziclague Oral apresenta melhores ações em relação a massa muscular e menor depósito de colágeno com maior área fibrogênica. No entanto é preciso prolongar mais o tempo de tratamento para melhor elucidação dos resultados.

Palavras-chave: *Alpinia*; Espasticidade muscular; Compressão da medula espinhal.

ABSTRACT

The spinal cord injury is responsible for several types of sequelae que alter the motor. How Complications From this trauma cause spasticity, a muscle Being THIS changes que More committed to the individual functionality. The Understanding About Mechanism of Action This generates hypertension New Research on the Ziclague®, and this Medicines Derived from the essential oil of *Alpinia zerumbet*, modulates calcium channels L-Type. Thus, the objective was to evaluate the muscle changes in murine model of Spinal Cord Injury after acute and subacute treatments with Ziclague®. The research was experimental with rats (*Wistar*) divided into six groups of six animals treated at 3 and 14 days, totaling 72 animals divided into Topic Ziclague® group (topical), Oral Ziclague (gavage), Baclofen (topical) Control (submitted to spinal cord injury without treatment), Laminectomy and Healthy (without being subjected to a surgical procedure). Behavioral analysis and histomorphological evaluation of the gastrocnemius spastic muscles were performed. It was applied ANOVA ONE WAY and ANOVA TWO WAY with post Tukey test, considering $p < 0.05$. The Oral Ziclague group showed better Basso Beattie and Bresnahan scores compared to groups Baclofen ($p < 0.01$) at 7 days, and Control ($p < 0.01$) at 14 days. The Ashworth Scale scores showed that in 14 days, the muscle tone of the treated groups showed significant difference from the Healthy and Laminectomy groups ($p < 0.001$). In the qualitative description, the groups Control and Baclofen presented a thick connective tissue, while groups Healthy, Laminectomy, Topic Ziclague® and Oral Ziclague obtained thin connective tissue. The groups Healthy, Topic Ziclague® or Oral Ziclague showed loose collagen and groups Control and Baclofen, dense collagen. Regarding to collagen organization, only the Control group had connective tissue modeled. In the histomorphological analysis, Oral Ziclague group presents better results in variable width of muscle bundle and myofibrils, followed by Topic Ziclague® group. For the width of the endomysium of Oral Ziclague, Topic Ziclague® and Baclofen showed smaller width in relation to the Control; and collagen invagination in the Oral Ziclague was lower compared to the Control. Regarding to the type of collagen, Baclofen (55.56% and 61.11%) and Topic Ziclague® (50 and 72.22%) showed moderately collagen type I and III. However, the Oral Ziclague (61.11% and 66.67%) had low and moderate collagen type I and III, respectively. So probably the Oral Ziclague shows better actions related to muscle mass and less collagen deposition with increased fibrogenic area. However it takes more prolonged treatment time for the better elucidation of the results.

Keywords: *Alpinia*; Muscle spasticity; Compression of the spinal cord.

1 INTRODUÇÃO

O processo desordenado de urbanização associado à violência urbana, tais como acidentes de trânsito e agressões por armas de fogo, implicou no aumento de lesões traumáticas atribuídas às causas externas (PEREIRA; JESUS, 2011; MELLO-SILVA *et al.*, 2012). Nesse contexto, encontra-se o traumatismo raquimedular (TRM) como um dos acometimentos que mais atingem a sociedade contemporânea e representa um problema relevante de saúde pública (BAUCHET *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010; NASSER *et al.*, 2014). Consiste em uma lesão medular espinhal com início súbito, que provoca danos sensoriais e motores ao indivíduo afetado, apresentando quadro funcional provisório ou irreversível (ALENAZI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

A análise global estimou a incidência dessas lesões entre 10,4 e 83 casos por milhão de habitantes ao ano (LONJON *et al.*, 2012). O Brasil encontra-se em segundo lugar no ranking mundial de maior incidência, sendo estimado que anualmente ocorram 50 novos casos para cada milhão de habitantes (SCHOELLER *et al.*, 2012). Segundo Yang *et al.* (2014), os mais acometidos são os adultos jovens, com idade entre 16 e 30 anos e em sua maioria (81,8%) do sexo masculino (MEYER *et al.*, 2003; PEREIRA; JESUS, 2011), embora a incidência feminina tenha aumentado nos últimos anos (CAMPOS *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas e comprometimentos neurológicos após o TRM estão diretamente ligados ao grau e nível da lesão (DIETZ, 2012). Quanto ao grau, as lesões são classificadas como completas, onde as perdas sensório-motoras são evidenciadas abaixo do nível da lesão; e incompletas, onde há preservação parcial da medula espinhal (TAGLIAFERRI *et al.*, 2006; CEREZETTI *et al.*, 2012). Os níveis das lesões medulares estão dispostos em prevalência da seguinte forma: 55% na região cervical, 15% na torácica, 15% na transição toracolumbar e 15% na lombossacral (MEYER *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2012; LONJON *et al.*, 2012).

As consequências repercutem negativamente nas atividades de vida diária dos indivíduos, sendo a espasticidade uma das implicações que mais comprometem a funcionalidade (SISCÃO *et al.*, 2007; CUFF *et al.*, 2014). Trata-se de uma sequela responsável por complicações secundárias às lesões do sistema nervoso central (SNC), evidenciadas por exacerbação dos reflexos miotáticos, modificações nas fibras musculares, na contração muscular e clônus (AWAAD; RIZK, 2012).

Os fenômenos fisiopatológicos da espasticidade envolvem o aumento da condutância nas correntes de cálcio do tipo L dependentes de voltagem em neurônios medulares, e estes, por sua vez, potencializam os canais de cálcio do tipo L nos músculos estriados, que também se encontram alterados após lesão (SMITH *et al.*, 2009). Com excesso de cálcio no sarcoplasma (ROY; EDGERTON, 2012), há hiperativação da banda-M da titina, reforço das

ligações cruzadas (OTTENHEIJM *et al.*, 2009), exacerbação da tensão passiva (OLSSON *et al.*, 2006), com posteriores alterações na matriz extracelular e colágeno (SOUZA; PINHAL, 2011). Essa característica muscular, principalmente da titina, induzirá a expressão da cadeia pesada da miosina (CPM) do tipo IIx, caracterizada por uma musculatura de baixo metabolismo glicogênico, fibras de contração rápida e facilmente fatigáveis (OLSSON *et al.*, 2006).

O tratamento proposto para a espasticidade visa amenizar os padrões anormais do movimento, influenciar o tônus, promover o relaxamento muscular, evitar contraturas e deformidades. As propostas terapêuticas mais utilizadas são: tratamento com toxina botulínica A, Baclofeno, benzodiazepínicos, tizanidina e tratamento fisioterapêutico (CHINELATO *et al.*, 2010; AWAAD, RIZK, 2012). Outra forma de tratamento que tem sido alvo de pesquisas são as plantas medicinais, por ser uma alternativa eficiente na promoção, prevenção e recuperação da saúde do indivíduo (AZIMI *et al.*, 2012; TROJAN-RODRIGUES, *et al.*, 2012). Dentre as plantas estudadas, tem-se a *Alpinia zerumbet* (*A. zerumbet*), planta herbácea, da família Zingiberaceae, originária da Ásia, encontrada comumente no nordeste brasileiro e conhecida popularmente como “colônia” (ALMEIDA, 1993; CORREA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011).

Estudos pré-clínicos têm demonstrado ações benéficas relacionadas a atividade antihipertensiva, diurética (SANTOS *et al.*, 2011), sedativa (MENDONÇA *et al.*, 1991), antioxidante (MASUDA *et al.*, 2000), antiulcerogênica e antifúngica (PRUDENT *et al.*, 1993) da *A. zerumbet*. Outros efeitos, estes considerados relevantes para o estudo da ação antiespasmódica em músculos estriados, incluem a ação moduladora dos canais de cálcio do tipo L, devido a presença dos princípios ativos 1,8 cineol e terpineno-4-ol capazes de promover o relaxamento muscular; ação anti-inflamatória (MAIA *et al.*, 2005) com diferenciação/remodelação de tecido conjuntivo e influência nos fibroblastos (SANTOSJÚNIOR, 2013), proporcionando redução das alterações de colágeno e normalização do tônus encontradas na hipertonía.

Assim, seus efeitos moduladores e miorrelaxantes reforçam a necessidade de estudos pré-clínicos voltados para a sequela da espasticidade, de modo a verificar as alterações musculares em modelo murino de lesão medular, a partir do uso do Ziclague®, bioproduto derivado do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz).

2 OBJETIVOS E HIPÓTESES OU PRESSUPOSTOS DO PROJETO

2.1 Objetivo geral

Avaliar as modificações após tratamentos agudo e subagudo com Ziclague® sobre as alterações musculares em modelo murino de traumatismo raquimedular.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar alterações comportamentais após uso do Ziclague® administrado de forma aguda e subaguda;
- Investigar alterações histomorfológicas promovidas pelo Ziclague® administrados de forma aguda e subaguda;
- Investigar neoformação de colágeno promovida pelo Ziclague® administrados de forma aguda e subaguda;
- Identificar o melhor resultado de acordo com a via de administração do medicamento testado.

2.3 Hipóteses

H0 - A utilização do Ziclague® não influenciará na melhora comportamental e histomorfológica independente da via de administração nos músculos pós-lesão medular.

H1 - A utilização do Ziclague® influenciará na melhora comportamental e histomorfológica independente da via de administração nos músculos pós-lesão medular.

3 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tecido Muscular e Fisiologia da Contração

O tecido muscular esquelético é responsável pelos movimentos do corpo e está organizado em feixes de células alongadas, cilíndricas, multinucleadas com estriações transversais. Sua origem embrionária é mesodérmica e ocorre a partir da fusão de células denominadas mioblastos. Devido às suas dimensões são também chamadas de fibras

musculares e estão envoltas por epimísio, perimísio e endomísio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; HALL; GUYTON, 2011).

As fibras musculares são formadas por um conjunto de miofibrilas, constituídas por filamentos proteicos finos e grossos de actina e miosina, respectivamente, os quais se organizam em unidades denominadas sarcômero (PIOVESAN, *et al.*, 2009; HALL, GUYTON, 2011). Este é compreendido por duas linhas Z, que permitem a interação entre as proteínas contráteis e constitui o limite entre um sarcômero e outro; duas bandas I, que se fixam à linha Z e são compostas predominantemente por filamentos de actina; e uma banda A, localizada entre as bandas I, com prevalência de filamentos de miosina, sendo também uma região onde sobrepõem-se os filamentos contráteis (BOFF, 2008; PIOVESAN *et al.*, 2009; GREIG, JONES, 2013).

Existe também um complexo proteico encontrado no filamento fino do sarcômero denominado troponina tropomiosina, responsável pela regulação da interação entre filamentos finos e grossos da unidade contrátil. Esse conjunto tem a função de impedir a ligação entre a actina e miosina durante o relaxamento muscular (NAVES, 2006; PIOVESAN, 2009).

Ainda sobre a estrutura muscular, no entorno das fibras são encontrados vasos sanguíneos e o sarcolema. Este último é circundado por túbulos T, dispostos em formato de redes e próximos ao retículo sarcoplasmático, região de armazenamento dos íons cálcio (Ca^{2+}). Este íon é um mensageiro secundário envolvido em diversas funções fisiológicas do organismo tais como liberação de neurotransmissores, transcrição de genes e no mecanismo de contração muscular (SILVA *et al.*, 2012). Esta organização permite que a onda de despolarização seja disseminada na superfície da fibra até as cisternas terminais, comandando a dilatação do retículo e liberação do Ca^{2+} para dar início ao mecanismo de contração muscular (NAVES, 2006; MAUGHAN; GLEESON, 2007).

Como mencionado acima, a despolarização é propagada do sarcolema para o interior da célula alcançando os túbulos T e cisternas terminais. Na membrana dos túbulos T existem as proteínas dihidropiridina (DHP), responsáveis pela inibição da abertura dos canais de cálcio. Com a transmissão do potencial de ação, essas proteínas sofrem modificações pelas proteínas receptoras de Rianodina (RyR1), as quais permitem a abertura dos canais de cálcio e consequente passagem desse íon do retículo para o citoplasma da fibra muscular. A mudança de conformação da proteína RyR1 é transmitida a proteína Triadina, mobilizando o cálcio ligado a Parvalbumina, Calsequestrina e Reticulina, aumentando ainda mais o nível de cálcio no citosol (NAVES, 2006).

Esse íon cálcio se liga à troponina C, desloca o complexo de tropomiosina, permitindo a aproximação entre a actina e a miosina. Neste momento, há uma diminuição da afinidade da miosina pela adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico, fazendo com que os dois produtos da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) se dissociem do sítio catalítico da miosina.

Simultaneamente à dissociação do fosfato inorgânico e do ADP, a cabeça da miosina se move e puxa o filamento de actina permitindo seu deslizamento sobre o filamento de miosina. Essa fixação entre os filamentos só é rompida quando há recaptação do cálcio, iniciando-se um novo ciclo (NAVES, 2006; MAUGHAN; GLEESON 2007).

Para a eficiência da contração muscular é necessário que haja uma tensão passiva do musculo estriado. A estrutura envolvida neste processo é o fuso muscular, também conhecida como titina. Segundo Kronbauer; Castro (2013) a titina sadia é responsável pelo aumento da força após alongamento ativo, resultando em indução da sua rigidez quando o músculo é ativado. Sua rigidez está relacionada com a tensão de forma cálcio-dependente (LBEIT, 2003). Estudos realizados por Ottenheijm *et al.* (2009) também demonstraram a influência de miofilamentos ao cálcio na dependência da região M da titina nas pontes cruzadas na regulação da contração muscular gerando força.

O grau de contração muscular irá depender da intensidade do estímulo e quantidade de fibras estimuladas. Assim, vários tipos de fibras são encontrados nos músculos esqueléticos e dividem-se de acordo com o tipo de contração: lentas (tipo I) ou vermelhas, devido a sua alta vascularização; rápidas (tipo II) ou brancas, com características anaeróbicas e baixa vascularização. As fibras rápidas ainda apresentam subdivisão: IIa (utilizam tanto o metabolismo glicolítico quanto oxidativo), apresentam contração rápida e são resistentes a fadiga; fibras IIb, utilizam metabolismo glicolítico para produção de energia; e IId ou IIx, são as menos oxidativas, com contrações rápidas fatigáveis (PIOVESAN *et al.*, 2009, GREIG, JONES, 2013).

3.2 Lesão Muscular

O músculo esquelético apresenta alta capacidade regenerativa em resposta ao dano grave. Quando lesado, diversos processos irão resultar na reparação tecidual, sendo ele: inflamação, ativação das células satélites, proliferação dos fibroblastos, miogênese e reorganização do tecido conjuntivo e matriz extracelular. Dentre os vários fatores que podem influenciar a estrutura muscular, merecem destaque o trauma direto (lesão por compressão), excesso de atividade, a própria contração do musculo e defeitos genéticos, todos eles caracterizadas por duas fases: degenerativa e regenerativa (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004).

O primeiro evento decorrente do processo lesivo é a degeneração muscular com início nos primeiros minutos após a lesão e duração de até 2 semanas. Inicialmente, há o rompimento do sarcolema resultante do aumento da permeabilidade das miofibrilas, refletindo níveis elevados de proteínas musculares, tais como a creatina quinase. O local afetado é invadido por células inflamatórias, miogênicas, as quais secretam citocinas e fatores de crescimento responsáveis pelo desenvolvimento do infiltrado inflamatório. Os neutrófilos são

as primeiras células a atingirem a musculatura, seguidas por macrófagos, de modo a fagocitar restos celulares da região afetada (KARALAKI *et al.*, 2009).

O processo degenerativo é seguido de reparação muscular e caracterizado por proliferação celular. Nessa fase, novas fibras musculares são formadas a partir da diferenciação de células miogênicas, seja para reparo ou formação de novas células musculares. Além disso, essa etapa pode ser composta por fibras com alta síntese proteica, a fusão celular pode ser focal para o local lesionado ou as fibras podem ser divididas em razão da fusão incompleta de fibras em regeneração. Após a fusão, há o aumento dos núcleos das fibras, os quais movem-se para a periferia e desse modo, o tecido muscular é restabelecido (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004).

Vários são os fatores contribuintes para o processo reparativo e de reconstrução das fibras musculares: células satélite, células-tronco, fatores tróficos e matriz extracelular. Um dos fatores que permitem a eficiência do tecido muscular é a presença de células mononucleadas denominadas células-satélite (SIRABELLA *et al.*, 2013). Estas são responsáveis pela origem dos mioblastos, os quais se fundem para gerar fibras musculares adultas. Além das células satélite, as células-tronco também são consideradas precursoras de células miogênicas de reparação celular, uma vez que a medula óssea e as células estaminais adultas têm poder de diferenciação na linhagem miogênica (KARALAKI *et al.*, 2009).

Os fatores de crescimento excretados são de fundamental importância para o entendimento do processo lesivo da musculatura, pois são responsáveis pela liberação de moléculas biologicamente ativas para o espaço extracelular. Estas moléculas podem ser produzidas pelo próprio tecido lesivo ou sintetizada por outros tipos de células, incluindo neutrófilos e macrófagos, com propósito de atuar no processo regenerativo. Dentre os fatores de crescimento reguladores, merecem destaque pela importância no presente estudo o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF β) (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004).

O FGF controla a proliferação e diferenciação celular, além de processos morfogênicos. Dentre os vários tipos de FGF existentes, o FGF-6 é o único que participa da reparação muscular, pois é estimulado após lesão do músculo esquelético. Suas quantidades elevadas são indicativo de processo inflamatório após rompimento do tecido, o que leva a proliferação através de células satélites, desencadeando quimiotaxia de outras células musculares precursoras (KARALAKI *et al.*, 2009).

Já o TGF- β é formado por fatores de crescimento multifuncionais e é a citocina prófibrogênica existente em diferentes isoformas, realizando papel fundamental na deposição de matriz extracelular (CHERESH *et al.*, 2013). Na fase aguda da lesão tecidual, o TGF- β promove o processo inflamatório, aumentando a atividade local. Isso porque o TGF- β é o

principal indutor da transdiferenciação de fibroblastos quiescentes em miofibroblastos (células que sintetizam proteínas efetoras a princípio pró-fibróticas, tais como α -SMA, colágeno tipo I, e fibronectina), o que contribui para o acúmulo e deposição de matriz extracelular através da regulação das atividades celulares, tais como a proliferação celular, diferenciação, adesão, migração e apoptose (SHI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015).

As lesões musculares são também verificadas em músculos espásticos, uma vez que apresentam alterações nos canais de cálcio. De acordo com Karalaki *et al.* (2009), o aumento de influxo de cálcio no sarcolema resulta em perda da homeostase, aumento da proteólise a partir de enzimas que podem clivar as miofibrilas e proteínas do citoesqueleto, desencadeamento, dessa forma, a degeneração hidrópica.

3.3 Tecido conjuntivo

O tecido conjuntivo tem como função a manutenção da forma do organismo, garantindo seu estabelecimento e desenvolvimento correto. Origina-se a partir do mesoderma, porém, o ectoderma também apresenta participação. O mesênquima, que consiste no tecido conjuntivo embrionário, se origina a partir de camadas laterais do mesoderma esplânico e dos somitos mesodérmicos, de modo que os demais tecidos conjuntivos se originam do mesênquima (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os componentes do tecido conjuntivo são divididos em constituintes celulares (fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos), e da matriz extracelular, de modo que o último envolve fibras (colágenas, reticulares, elásticas) e substância fundamental amorfa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os fibroblastos são as células mais abundantes do tecido conjuntivo, apresentando uma forma quiescente, com menor taxa de síntese, os fibrócitos. São células fixas e alongadas, com citoplasma abundante, rico em retículo endoplasmático e aparelho de Golgi bem desenvolvidos. Seu núcleo é fusiforme com um ou mais nucléolos evidentes e a principal função desta célula é sintetizar colágeno e elastina, além de proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas, que farão parte da matriz extracelular, sendo assim o principal responsável pela formação das fibras e substância fundamental amorfa. Os fibroblastos também produzem fatores de crescimento que atuam no metabolismo celular, participando dos processos de cicatrização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os macrófagos se originam a partir dos monócitos, células do sangue, que por diapedese chegam ao tecido conjuntivo e são responsáveis pelo sistema monocítico fagocitário. Após a limpeza no tecido, os fibroblastos ativos no local preenchem o espaço com colágeno (ECHEVERR *et al.*, 2004).

Os mastócitos são células grandes, livres, com presença de grânulos metacromáticos em seu citoplasma. Sua principal função é armazenar potentes mediadores químicos da inflamação, tais como a heparina, histamina, serotonina e fator quimiotático dos eosinófilos, que quando liberados, promovem reações de sensibilidade imediata, atraindo leucócitos até a região e provocando a vasodilatação (MACIEL; MORFIN, 2009).

Os plasmócitos são células ovóides, com citoplasma basófilo, núcleo esférico com presença de cromatina em forma de raio. São originados a partir dos linfócitos B do sangue, os quais adentram o tecido conjuntivo e diferenciam-se em plasmócitos. Sua função é produzir anticorpos que atuam nas respostas imunes do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os leucócitos são os glóbulos brancos do sangue, suas células chegam ao tecido conjuntivo por diapedese através de capilares ou vênulas e são classificadas em granulócitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos) ou agranulócitos (linfócitos e monócitos). Sua ação se torna mais intensa nos locais em que ocorre invasão por microrganismos, desencadeando assim, o processo inflamatório (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Outro componente do tecido conjuntivo são as fibras, formadas por proteínas cujas estruturas se polimerizam, de modo a formar estruturas alongadas. Estas se organizam em dois sistemas: o sistema colágeno, que engloba as fibras colágenas e reticulares; e o sistema elástico, formando fibras elásticas, elastínicas e oxitalânicas. Para o presente estudo, a abordagem neste capítulo será somente sobre as fibras colágenas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O colágeno é a proteína mais abundante no organismo, sintetizada por diferentes tipos celulares e apresentam composição química, características morfológicas, distribuição e funções distintas. No músculo típico, o colágeno é altamente organizado em torno de fascículos ou grupos de miofibrilas e apresenta papel importante na transdução de força e rigidez muscular, garantindo alinhamento através das ligações das fibras musculares (BOOTH *et al.*, 2001). A força e tensão do colágeno decorrem das ligações cruzadas inter e intramoleculares, da orientação de seus feixes, das forças de fricção, da densidade entre as fibrilas e interação com componentes da matriz extracelular, o que permite o funcionamento do músculo como uma unidade de força de contração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Já a substância fundamental amorfa é uma mistura de moléculas aniônicas altamente hidratadas, as glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas. Localiza-se entre as células e as fibras e permite a difusão tissular e produtos do metabolismo entre os capilares sanguíneos, linfáticos e as células. Sua função é preencher o espaço entre as células, atuar como lubrificante e como barreira protetora contra microorganismos. Além do papel estrutural da matriz, elas podem se ligar a fatores de crescimento, participando da regulação do metabolismo celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Em relação aos tipos de tecido conjuntivo, as diferentes classificações refletem a morfologia e funcionalidade do tecido, identificando a organização estrutural, bem como seus componentes principais. Assim, o tecido classifica-se em: tecido conjuntivo propriamente dito, tecido conjuntivo de propriedades especiais e tecido conjuntivo de suporte. Para o presente estudo, será abordado a seguir apenas sobre o tecido conjuntivo propriamente dito, dividido em frouxo e denso (modelado e não modelado) (KIERSENBAUM, 2004).

O tecido conjuntivo frouxo fornece suporte às estruturas que normalmente não são submetidas à grandes pressões ou atritos, sendo formado por células, fibras e matriz extracelular. Apresenta consistência delicada, flexível, vascularizada e pouco resistente a trações. Está presente ao redor dos vasos sanguíneos e nervos, entre os feixes musculares e as camadas de musculatura lisa dos órgãos ocos (KIERSENBAUM, 2004).

Já o tecido conjuntivo denso é mais flexível e resistente às trações e apresenta menos células do que no tecido conjuntivo frouxo, dentre as quais merece destaque os fibroblastos com predomínio de fibras colágenas. Classifica-se em modelado (regular) ou não modelado (irregular). O tecido modelado apresenta feixes colágenos orientados segundo, paralelos, alinhados aos fibroblastos. Além disso, suas fibras oferecem grande resistência às forças que normalmente atuam sobre o tecido, sendo encontrados nos tendões, ligamentos cartilaginosos e elásticos. O tecido não modelado se dispõe em feixes arranjados sem orientação fixa, o que permite ao tecido resistência às trações exercidas em qualquer direção (KIERSENBAUM, 2004).

3.4 Traumatismo Raquimedular

O TRM é um acometimento à medula espinhal consequente do trauma dos elementos neuronais presentes no canal vertebral. A medula é parte do SNC responsável pela condução dos impulsos nervosos e está contida na coluna vertebral, protegida pelas vértebras, ligamentos, músculos, além das meninges e do líquido. Apresenta substância cinzenta e branca, ambas lesadas durante o trauma medular (ALENAZI *et al.*, 2013).

Estima-se que entre 9 e 50 casos /milhão de habitantes sejam acometidos pelo TRM e esse índice é mais frequente nas cidades (BRITO, 2011). No Brasil, esse número representa cinco a seis mil novos casos de TRM a cada ano, sendo de 30 anos a faixa etária da população mais afetada (CEREZETTI *et al.*, 2012). Quanto ao gênero mais afetado pelo TRM, o masculino passa a ser predominante devido ao tipo de atividades desenvolvidas, por exercerem profissões muitas vezes com alta periculosidade, maior exposição e imprudência no trânsito, além de envolvimento em brigas e agressões (PÉREZ *et al.*, 2012).

De etiologia traumática, o TRM ocorre em cerca de 20% das fraturas vertebrais e está associada a sintomas sensório-motores (FRANZOI *et al.*, 2009). Seus níveis de lesão estão dispostos em prevalência como: 55% na região cervical, 15% na torácica, 15% na transição toracolumbar e 15% na lombossacra (MEYER *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2012; LONJON *et al.*, 2012). Porém, estudos de Gaspar *et al.* (2003) evidenciaram o segmento da coluna torácica como a área mais acometida, tendo como principal etiologia as agressões por arma de fogo e os acidentes de trânsito. Para Mello-Silva *et al.* (2012), a violência urbana é considerada um problema social dos países em desenvolvimento que altera a qualidade de vida da população e é fator contribuinte para a alta morbimortalidade, principalmente em indivíduos jovens.

De acordo com Mello-Silva *et al.* (2012), o crescimento da violência urbana proporcionou o aumento de vítimas com lesão raquimedular e as fraturas da coluna vertebral apresentam maior morbimortalidade na população mundial. Assim, trazem repercussões negativas tanto para os indivíduos devido às deficiências e impactos psicossociais, como para o governo em relação aos altos custos envolvidos no tratamento, tais como internações e permanências hospitalares prolongadas (VASCONCELOS; RIBEIRO, 2011; WANG *et al.*, 2014).

Sua fisiopatologia é decorrente da transferência da energia cinética do trauma para o tecido nervoso (NICHOLLS; SAUNDERS, 1996; SCHWAB; BARTHOLDI, 1996). A depender do mecanismo e intensidade do trauma, o TRM pode ser classificado em total ou parcial e suas alterações sensório-motoras estão relacionadas ao nível de comprometimento neurológico, com quadros funcionais caracterizados em leve, moderado ou grave (ALENAZI *et al.*, 2013; STROMAN *et al.*, 2014). Divide-se em três fases, apresentando a seguinte ordem cronológica: aguda ou lesão primária, quando ocorrem segundos a minutos após a lesão, subaguda ou secundária, entre minutos e semanas após o acometimento; e crônica, quando passados meses ou anos após o trauma (HYUN, KIM; 2010).

No momento do trauma (lesão primária), ocorre o rompimento de neurônios seguidos de um bloqueio parcial ou total na condução do potencial de ação. Os axônios quando rompidos apresentam difícil poder regenerativo devido à presença do processo inflamatório (hemorragia, isquemia e edema) e formação da cicatriz glial em decorrência da hipertrofia, uma vez que no centro da lesão formam-se cistos inicialmente preenchidos por fluidos que posteriormente, são circundados por tecido cicatricial, composto por astrócitos reativos, micróglia e fibroblastos (FAWCETT; ASHER, 1999; MC DONALD; SADOWSKY, 2002; SCHWAB *et al.*, 2006). No SNC, este tecido cicatricial é responsável pela produção de moléculas inibitórias do crescimento axonal (BATCHELOR, 2008).

De acordo com Silva *et al.* (2014), essa lesão primária é conhecida também como choque medular, definida como uma repentina perda de todas as funções neurológicas abaixo

do nível da lesão, mesmo que esta lesão não seja completa e permanente no momento em que ocorre o dano neurológico à medula espinhal. Nesta condição, os músculos que são inervados pelos segmentos da medula abaixo do nível da lesão tornam-se paralisados e os reflexos ficam ausentes. Nesse estágio, também ocorre o rompimento dos vasos sanguíneos e axônios, com consequente interrupção da microcirculação e presença de vasoespasmos.

Após a lesão, 50% dos oligodendrócitos presentes na substância branca morrem nas primeiras 24 horas e essa morte resulta em bloqueio dos impulsos nervosos pela desmielinização axonal existente, contribuindo para a incapacidade funcional. A lesão resulta no acentuado rompimento e reorganização de vias neurais ascendentes e descendentes, criando modificações substanciais nos aferentes primários, interneurônios e motoneurônios, influenciando assim a interação sensório-motora (LYTLE *et al.*, 2006).

A lesão secundária é caracterizada por um dano neurológico maior, apresentando os seguintes eventos: alterações vasculares que incluem a hemorragia, vasoespasmos e infiltrados inflamatórios; formação de radicais livres que causam a morte em neurônios situados na medula espinhal; presença de apoptose após a lesão medular evidenciadas em análise morfológica e bioquímica; e resposta inflamatória com o infiltrado de leucócitos que vão liberar rapidamente uma quantidade aumentada de citocinas permitindo o maior extravasamento desses leucócitos e reparo ao dano tecidual. Além disso, o desequilíbrio do sódio, potássio e cálcio, leva a despolarização das membranas celulares, insuficiência da ATPase e aumento da concentração do cálcio dentro da célula, desencadeando a hipertonia, uma das sequelas presentes na fase crônica do TRM (GWAK; HULSEBOSCH, 2011).

Dentre as implicações do TRM, a espasticidade é o fator mais agravante para o indivíduo em sua fase crônica, por se tratar de um comprometimento funcional que influencia de maneira negativa na qualidade de vida. Trata-se de um achado importante da Síndrome Piramidal (SP) decorrente da interrupção das vias inibitórias do arco reflexo do trato reticuloespinal, apresentando aumento do tônus muscular, presença de espasmos musculares e clônus (SILVA *et al.*, 2014).

3.5 Espasticidade

A espasticidade é o distúrbio mais comum em lesões congênitas ou adquiridas do sistema nervoso central, que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo (PAVAN *et al.*, 2010). É definida como um estado de tensão exacerbado do músculo, resultante de uma lesão do neurônio motor superior, em que há uma ativação muscular involuntária devido ao conjunto de sintomas caracterizados por hiperreflexia e aumento do tônus muscular (NITRINI *et al.*, 2005; SORIANO *et al.*, 2012). Os motoneurônios estão distribuídos no córtex motor e corno

ventral da medula. Na medula espinhal, são classificados em alfa e gama, exercendo papel de comunicação de impulsos nervosos entre o sistema nervoso central e periférico (LUNDY-ECKMAN, 2004).

A lesão gera correntes persistentes de cálcio do tipo L medulares e musculares dependentes de voltagem, resultando em aumento da excitabilidade dos motoneurônios alfa e gama. Essa condição altera a fisiologia da contração muscular, uma vez que, a ausência de ATP ou a concentração sustentada de cálcio no sarcoplasma causa alterações nas propriedades contráteis, eleva a tensão passiva, reforça as ligações cruzadas e como consequência, desencadeia a hipertonia do tipo elástica (SWEENEY; STULL, 1990; GORDON *et al.*, 2000; CHENG; LEDERER, 2008).

As lesões do SNC são causadoras de SP, comprometendo os impulsos químicos descendentes para a medula e unidades motoras. A acetilcolina se encontra interrompida ou diminuída na junção neuromuscular. Entretanto, Smith *et al.* (2009) apresentou em um dos seus trabalhos, que o gene de canais de potássio voltagem dependente de cálcio intracelular (KCNN3) apresentou-se com expressão aumentada. Essa expressão aumentada induz a pós-hiperpolarização e esse comportamento é característico de músculos imaturos sendo anulada após a inervação dos músculos.

As altas concentrações crônicas de Cloreto de potássio (KCl) induzem hiperpolarização, limitando o disparo da unidade motora. Esse achado é normalmente expresso em músculos imaturos e inibida após essa maturação (SMITH *et al.*, 2009).

Já nos músculos, Smith *et al.* (2009) relatam que os genes dos receptores rianodínicos responsáveis pela liberação dos canais de cálcio no retículo sarcoplasmático não foram alterados, assim como houve regulação negativa dos genes FKBP1A e PDE4D (reguladores do extravasamento desse cálcio). Entretanto, o aumento crônico do cálcio intracelular ocorreu por aumento da expressão do gene de regulação dos canais de cálcio do tipo L (CACNB1 e CACNA1S) estimulando os receptores rianodínicos (SMITH *et al.*, 2009). O gene CACNA1S é expresso no início da excitação-contração muscular (CATTERALL, 2011), com mudança conformacional decorrente da alteração de voltagem para a excitação da célula primariamente ao “gating” que é secundário (HERNANDEZ-OCHOA; SCHNEIDER, 2012).

As proteínas Parvalbumina (gene PVALB) e Triadina (gene TRDN) se apresentaram drasticamente aumentadas de forma significativa. As tentativas musculares de regulação dos canais de cálcio do tipo L são demonstradas por esse aumento da regulação do TRDN (GUO; CAMPBELL, 1995), com intuito de forçar o relaxamento muscular (WILWERT *et al.*, 2006).

Nesse entendimento, os níveis de cálcio cronicamente alterados subsequentemente ativam as proteases que são ativadas pelo cálcio intramuscular, causando lesões musculares drásticas. Também foi encontrado aumento da regulação da expressão de ubiquitina justificando ainda mais a degradação muscular (SMITH *et al.*, 2009), por ser essa a proteína

responsável pelo processo enzimático que envolve a degradação e apoptose celular (ADAMS, 2003)

Embora os mecanismos fisiopatológicos não sejam completamente elucidados, estudos comprovam que os músculos hipertônicos apresentam alterações que vão além do excesso de cálcio. Outros achados morfológicos envolvidos na espasticidade são a titina, colágeno, matriz extracelular e cadeia pesada da miosina do tipo IIX (BOOTH *et al.*, 2001; LIEBER, 2003; LI; LI; BENNET, 2003; OLSSON *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2011).

A titina, proteína situada no interior dos sarcômeros e responsável pela regulação do comprimento sarcomérico e interação com as proteínas actina e miosina, também representa a descrição de mudança no comprimento do sarcômero em repouso no músculo espástico (FRIDÉN; LIEBER, 2003; CASTRO-FERREIRA *et al.*, 2011). Segundo Fridén e Lieber (2003), as variações das isoformas da titina promovem alterações na rigidez muscular, principalmente nos músculos esqueléticos. Ela também representa a descrição de mudança no comprimento do sarcômero em repouso no músculo esquelético espástico.

Foran *et al.* (2005) em seu estudo de revisão relata que não existem demonstrações definitivas de alteração da titina secundariamente à espasticidade, mas sugere que é possível diferenças no sequenciamento de ácido desoxirribonucleico (DNA) da titina do músculo espástico, possibilitando a expressão de várias isoformas musculares. Portanto, é razoável especular que a isoforma titina pode ser alterada no músculo esquelético em paciente espásticos.

Já os realizados de Smith *et al.* (2011) mostraram que, embora o tamanho da isoforma titina esteja relacionada com a tensão muscular passiva, não foram encontrados achados quanto a sua alteração em isquiostibiais de crianças com paralisia cerebral espástica. Olsson *et al.* (2006) em seu estudo mostrou que o tamanho molecular da proteína titina manteve-se inalterada em espasticidade ao examinar o músculo vasto lateral de pacientes lesados medulares com espasticidade.

Entretanto Kellermayer e Grazier (1996) em experimento *in vitro* sugere haver função da titina sadia, além da tensão passiva, atuando na contração muscular na forma cálcio-dependente dos filamentos actina-miosina do sarcômero. Essa ideia é compartilhada por Joumaa *et al.* (2007) e Kronbauer e Castro (2013) quando relatam que a titina sadia é responsável pelo aumento da força após alongamento ativo, resultando em indução da sua rigidez quando o músculo é ativado. A rigidez da titina está relacionada com a tensão de forma cálcio-dependente (LBEIT, 2003). Estudos realizados por Ottenheijm *et al.* (2009) também demonstraram a influência de miofilamentos ao cálcio na dependência da região M da titina nas pontes cruzadas na regulação da contração muscular gerando força.

Já Mateja *et al.* (2013) afirma que na ausência de titina sadia haverá redução de tensão por diminuição na sensibilidade ao cálcio, afetando a cinética das pontes cruzadas que influenciam o mecanismo básico do comprimento dos músculos estriados.

A compreensão dos mecanismos a nível celular e bioquímico sobre a espasticidade deve ser estudada, principalmente no que diz respeito ao tecido conjuntivo. Nesse sentido, merece destaque o colágeno e matriz extracelular. Em estudos realizados em crianças com Paralisia Cerebral (PC), foi comprovado que na hipertonia há o acúmulo do teor de colágeno, com alterações nas propriedades mecânicas do músculo, ocasionando o desenvolvimento de contraturas, o que confirmou a correlação existente entre aumento do colágeno de acordo com o grau da espasticidade (BOOTH *et al.*, 2001).

Smith (2011) em seu estudo baseado em biópsias dos músculos isquiotibiais de crianças com PC demonstrou existência de alterações dentro da matriz extracelular com o aumento da quantidade de teor de colágeno, que contribuem para o aumento da contratura e rigidez passiva do músculo espástico.

O aumento da rigidez passiva devido às alterações no tecido do colágeno também foi evidenciado por Sinkjaer *et al.* (1993) e Sinkjaer; Magnussen (1994). O'Dwyer (1996) e Gracies (2005) relataram que a rigidez intrínseca das fibras musculares e a perda de sarcômeros são fatores contribuintes para o aumento da rigidez passiva. Reforçando esta afirmação, Dietz; Sinkjaer (2007) relataram que as alterações secundárias nas propriedades mecânicas da fibra muscular são importantes no mecanismo de espasticidade.

A vinculação da rigidez passiva com o colágeno é melhor entendida pela afirmação de Franken (2010) quando demonstraram que a flexibilidade muscular fornecida pelo colágeno está relacionada com as ligações cruzadas. Sendo estes inversamente proporcionais, quanto maior síntese de colágeno novo, menor o número de ligações cruzadas, e como resultado, maior flexibilidade. Gordon *et al.* (2000) e Cheng; Lederer (2008) completam que a menor angulação das pontes cruzadas gera força proporcional a tensão passiva de acordo com a concentração do cálcio.

Já a matriz extracelular é uma substância secretada pelas células que funciona para instruir o fenótipo celular, tendo assim uma função dinâmica, não sendo apenas uma estrutura passiva. É composta por uma rede de moléculas como as proteínas e polissacarídeos, responsáveis pela interação da matriz extracelular e receptores da superfície celular, permitindo a participação desta em vários eventos como adesão, migração, proliferação, diferenciação celular e apoptose e angiogênese. (SOUZA; PINHAL, 2011; JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J., 2008).

Um estudo realizado por Smith (2011) demonstrou que a rigidez na matriz extracelular em músculos isquiotibiais de crianças com PC leva a um aumento da tensão passiva. Em contrapartida, de acordo com os achados de Lieber *et al.* (2003), as alterações na matriz

extracelular são evidentes, porém, com diminuição da tensão passiva em feixes de fibras de pacientes hipertônicos. Essa modificação no tecido conjuntivo é acordada por Olsson *et al.* (2006), entretanto, segundo ele, é decorrente da resistência passiva.

Bakheit *et al.* (2011) relata que o aumento da resistência passiva se deve a lesão de motoneurônios superiores e é reconhecida como um dos fatores de influência para a espasticidade. De acordo com Olsson *et al.* (2006), a resistência passiva na espasticidade está vinculada ao remodelamento ultra estrutural, expressando cadeia pesada da miosina de fibra do tipo IIx, indicando assim, um aumento da tensão passiva em músculos espásticos por comprometimento da matriz e das fibras musculares.

Nos músculos, as proteínas mais influenciadas pelo cálcio para geração de forças são as cadeias de miosina (MILLER *et al.*, 1985; SCHIAFFINO *et al.*, 2007), principalmente a cadeia pesada da miosina do tipo IIx, além de miosinas imaturas. Essas mudanças geram perda da atividade metabólica com transcrição vinculadas as mitocôndrias. Mesmo Smith *et al.* (2009) relatando mudanças do fenótipo de fibras musculares lentas para rápidas, foi também observado aumento da transcrição gênica vinculada ao fenótipo de fibras lentas, especificamente Calmodulina (gene CALM1) e Calcineurina (PPP3CA) (SCHIAFFINO *et al.*, 2007).

De acordo com Olsson *et al.* (2006), foi observada uma alteração relevante na mecânica do movimento nas fibras musculares, expressando cadeia pesada da miosina (CPM) quase 10 vezes a mais. Essa expressão é encontrada nas fibras musculares rápidas expressando CPM de isoformas do tipo IIx em comparação com as fibras que expressaram CPM de isoforma do tipo I. Ainda de acordo com Olsson *et al.* (2006), as fibras de contração rápida apresentaram um aumento significativo da tensão passiva, ou por mudança das fibras para a CPM isoforma tipo IIx, ou em combinação dela com a CPM IIa. Resultado semelhante foi encontrado por Pontén, Stal (2007) em um estudo feito nos músculos bíceps braquial em adultos jovens com paralisia espástica. Verificou-se maior expressão das fibras CPM IIx e menor expressão para as fibras CPM I. Outras alterações encontradas por Olsson *et al.* (2006) foram a redução dos capilares e do volume mitocondrial. Uma pesquisa comparativa do músculo vasto lateral parético e não parético em pacientes com Acidente Vascular Cerebral (AVC) realizada por Mackenzie *et al.* (2008), também demonstrou mudança para CPM IIx do músculo vasto lateral na perna hemiparética quando comparada com a perna sadia.

Para Foran *et al.* (2005), a hipertonia muscular tem graves efeitos negativos sobre desempenho motor e qualidade de vida em pacientes com lesão do motoneurônio superior e várias são as alterações associadas a capacidade funcional que englobam a mecânica do movimento, do tecido e da morfologia muscular. Desta forma, tanto os canais de cálcio quanto as estruturas dos músculos espásticos encontram-se alterados de forma típica à lesão do trato

córtico- espinhal. Neste contexto, os modelos murinos se mostram importantes para averiguar as alterações desses mecanismos.

3.6 Modelos murinos

Para melhor compreensão do processo de espasticidade, foram descritos os seguintes modelos experimentais: compressão medular gerada a partir de um clipe de aneurisma, hemissecção medular, trauma medular através de um impactador ligado a um software e utilização de um estereotáxico modificado para reprodução da lesão medular aguda (ONIFER *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2010).

O modelo murino de lesão medular a partir do clipe de aneurisma foi descrito inicialmente por Rivlin e Tator (1978), produzindo uma compressão extradural a nível de T6T7 com um grampo de aneurisma e força de fechamento pré-determinada com tempo variável. Demonstrou ser um modelo clinicamente relevante e reproduzível de lesão medular, principalmente por apresentar correlação com resultados funcionais e histológicos (DOLAN *et al.*, 1980; POON *et al.*, 2007; IMPELLIZZERI *et al.*, 2012).

Outro método utilizado é o da hemissecção medular, em que metade da medula espinhal é preservada e sua porção contralateral é seccionada utilizando microtesouras. Acredita-se que esse mecanismo cirúrgico possa bloquear as vias ascendentes e descendentes em diferentes níveis de lesão medular, além de permitir o estudo dos mecanismos que comandam a inibição ou regeneração axonal em todo ou em torno da injúria, bem como dos déficits funcionais e potencial de recuperação (ONIFER *et al.*, 2007; YING *et al.*, 2008).

O avanço das pesquisas em TRM levou ao desenvolvimento de um sistema computadorizado, desenvolvido pela Universidade de Nova Iorque chamado Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS). Trata-se de uma contusão cinética a partir da queda de peso com alturas alternadas de 6.25, 12.5, 25.0 e 50.0 mm. As vantagens desse dispositivo são: monitoramento de parâmetros de prejuízo tais como a velocidade de impacto e deslocamento do tecido e a capacidade de provocar a lesão sem previamente ter tocado na medula espinhal, uma vez que qualquer contato com esta antes do golpe pode alterar o resultado pretendido (ONIFER *et al.*, 2007).

Como o método descrito acima apresenta elevado custo, um modelo mais acessível e semelhante ao impactador denominado estereotáxico adaptado vem sendo utilizado. O aparelho, confeccionado pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, tem a capacidade de reproduzir o trauma por meio da colocação de pesos de 50,5g e 70,5g a nível de T13 por um período de 5 minutos (SILVA *et al.*, 2008). Foi observado que o peso de

50,5g a nível de T13 durante 5 minutos causou um trauma medular de grau moderado em ratos e que 70,5g resultou em paraplegia bilateral grave simétrica dos membros inferiores. Assim, representa um modelo murino capaz de reproduzir uma lesão medular aguda através de um método eficiente, simples, econômico e por esta razão, executado no presente estudo (TORRES *et al.*, 2010).

3.7 Testes comportamentais

Após o procedimento cirúrgico, os animais devem ser submetidos a testes comportamentais e neurológicos, de modo a verificar o grau e evolução da lesão. Dentre os mais utilizados estão a escala Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e escala de Ashworth modificada (EAM).

A escala BBB foi desenvolvida e validada para avaliar a capacidade locomotora pós-lesão medular. Suas vantagens incluem a facilidade de execução, ausência de ambiguidades dos termos e observação da função motora do animal que vai da completa paralisia à movimentação normal. Para isso, o animal é colocado em um campo aberto durante 4 minutos, podendo ser avaliado por mais de um examinador que em caso de discordância dos resultados, o escore mais baixo é o adotado (WANG *et al.*, 2009). O teste apresenta escores que variam de 0 a 22, quantificando de maneira convincente a recuperação motora no TRM (MOLINA *et al.*, 2004).

Para avaliação da espasticidade, optou-se por utilizar a EAM. Trata-se de uma escala para medir a anormalidade de tônus seja de origem mecânica ou neural, através da resistência à movimentação passiva. Apresenta 5 escores com classificação de 0 (sem aumento do tônus) a 4 (membro rígido em flexão ou extensão) (BLACKBURN *et al.*, 2002). Apesar de seus escores não fornecerem uma medida direta da atividade reflexa muscular, é a mais utilizada para avaliar o efeito de tratamentos com fármacos para espasticidade (CAMPANINI *et al.*, 2011).

3.6 Tratamentos

3.8.1 Tratamento alopático para a espasticidade

O tratamento para o TRM vem se modificando e evoluindo ao longo dos anos. O custo anual médio no Brasil é de aproximadamente 660 milhões de reais com progressão desse

valor, devido à maior expectativa de vida do lesado medular e aumento de sua incidência (TEDESCO *et al.*, 2012).

Após a injúria, o tratamento mais utilizado tem sido a metilprednisolona, atuando como inibidor da peroxidação lipídica (LAURINDO *et al.*, 2009). Já as formas de tratamento voltadas para a sequela da espasticidade envolvem procedimento cirúrgico, uso de medicamentos alopáticos (baclofen, diazepam, dantrolene, clonidina, tizanidina, clorpromazina, morfina) e tratamento local.

Os medicamentos citados diminuem a excitabilidade dos reflexos espinhais, reduzindo temporariamente a hipertonia e a chance dos pacientes realizarem cirurgias ortopédicas (TEIVE *et al.*, 1998). Como o baclofen foi utilizado no presente estudo em um dos grupos experimentais, faz-se necessário uma maior abordagem deste. Atua de forma centralizada, ligando-se aos receptores de GABA-B no cérebro e membranas espinais, restringindo o fluxo de cálcio para os terminais nervosos pré-sinápticos, reduzindo, assim, a espasticidade. O baclofen é indicado quando a espasticidade é de origem medular e seus efeitos clínicos incluem diminuição da resistência à amplitude de movimento passivo, da hiperreflexia e redução da espasticidade e clônus (AWAAD, RIZK, 2012).

Como qualquer medicamento apresenta efeitos colaterais e adversos, suas indicações são limitadas por produzirem sedação, cansaço, sonolência, déficit de atenção e memória, relacionadas à depressão do SNC e existe uma preocupação com os efeitos colaterais cognitivos que são dependentes das doses indicadas (TILTON, 2006; QUAGLIATO *et al.*, 2006). Além disso, de acordo com Hefferan *et al.* (2006), a modulação da espasticidade com uso do Baclofeno acontece somente na fase inicial.

O tratamento local é através da Toxina Botulínica aplicada em músculos espásticos, com objetivo de melhorar a capacidade funcional, uma vez que atua na junção neuromuscular, bloqueando a liberação do neurotransmissor acetilcolina a nível présináptico, levando a paresia muscular. (TEIVE, 1998; TEDESCO *et al.*, 2012).

3.8.2 Fisioterapia

A fisioterapia neurológica é outro destaque em tratamento e preocupa-se com redução de atividades dos músculos espásticos. Deve ser iniciado o mais breve possível e tem como objetivo inibir a atividade reflexa patológica para influenciar o tônus muscular obtendo assim, o reaprendizado motor. Entende-se por inibição da atividade reflexa patológica o combate a padrões anormais de movimento e para isso, tem-se a adoção de posicionamento e aquisição de novas posturas, desencadeando estímulos que favorecem os padrões normais (TEIVE, 1998). A mobilização articular vem sendo amplamente inserida no tratamento fisioterapêutico

e consiste em movimentos passivos que visam à recuperação da artrocinemática, além de promover redução da dor e edema, aumento da amplitude de movimento e melhora a função motora (ZUARDI *et al.*, 2010).

De acordo com Sartori *et al.* (2009), o papel da fisioterapia tem como objetivo promover a independência e qualidade de vida ao indivíduo portador da lesão medular, de modo a prevenir deformidades e complicações, treinar equilíbrio, maximizar função muscular e respiratória e treinar marcha de modo a reinserir o indivíduo a sociedade em suas atividades de vida diária (SARTORI *et al.*, 2009; BERTOLDI *et al.*, 2011).

3.8.3 Fitoterapia

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que em torno de 80% da população mundial utilizam alguma planta medicinal no alívio dos sintomas. Somente a partir dos levantamentos etnofarmacológicos, as plantas medicinais começaram a ter respaldo científico. Atualmente, com apoio da OMS, a medicina tradicional vem sendo resgatada, uma vez que sempre constituiu uma alternativa terapêutica utilizada e culturalmente difundida na busca da promoção da saúde (RUTKANSKIS; CRUZ-SILVA, 2009; SAHRANAVARD *et al.*, 2014).

Os medicamentos fitoterápicos possuem diferentes formas de apresentação e podem ser usados por variadas vias de administração. Comumente os encontramos para uso por via oral, na forma de pó para diluição, decocções, infusões ou chás. Já por via tópica apresentam-se na forma de preparações à base de água ou óleo (WAGNER; WISENAUER, 2006). Uma das formas de utilização terapêutica das plantas é através dos seus óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, 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).

Assim como os tratamentos convencionais, o tratamento fitoterápico apresenta alto custo de pesquisa e produtividade e não podem ser confundidos com a medicina popular ou alternativa. Apesar de serem baseados pelos conhecimentos etnofarmacológicos, são submetidos ao controle da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comprovação dos seus benefícios científicos (REZENDE; COCCO, 2002). Apesar dos altos custos associados à fitoterapia, quando comparados aos medicamentos convencionais, estes apresentam vantagens econômicas relevantes. Além disso, os efeitos adversos e colaterais dos produtos naturais são menos agressivos, o que proporcionam melhor condição de saúde para população. Isso não significa que os fitoterápicos não causem riscos ao organismo,

fazendo-se necessário pesquisas que reproduzam sua qualidade, eficácia e segurança do seu uso (VIEIRA *et al.*, 2010).

A inclusão da fitoterapia nos serviços de saúde pública brasileiros incentiva as práticas naturais de cuidado à saúde, bem como a integração do conhecimento popular ao científico. A base operante do Sistema Único de Saúde (SUS) é a Estratégia da Saúde da Família (ESF), em que o maior foco é a atenção primária à saúde, ocorrendo à inversão de valores, uma vez que a doença era anteriormente, a maior preocupação do indivíduo (SAHRANAVARD *et al.*, 2014). Desta forma, a promoção da saúde não apresenta responsabilidade em apenas um setor, mas sim de uma esfera que envolve governos municipal, estadual e federal. Dentre as 71 plantas listadas e utilizadas no SUS, encontra-se a *A. zerumbet*, utilizada no presente estudo e será abordada a seguir.

3.8.3.1 *Alpinia zerumbet*

A *Alpinia zerumbet* é uma planta herbácea, perene e aromática conhecida popularmente como “colônia”, “água de alevante”, “bastão do imperador”. Pertencente à família Zingiberaceae, é originária da Ásia e encontrada em abundância no nordeste brasileiro, em climas tropicais e subtropicais, podendo atingir de 2 a 3 metros de altura (BEZERRA *et al.*, 2000; ALBUQUERQUE; NEVES, 2004).

Essa espécie apresenta como constituintes químicos os alcaloides, flavonoides, catequina, epicatequina evidenciados inicialmente por Kimura *et al.*, (1966). Já o óleo essencial possui mono e sesquiterpenos, sendo o cineol, terpinol, rutina e dois derivados glicosídicos do Kaempferol os constituintes encontrados em maior concentração.

Desde a década de oitenta são realizados estudos pré-clínicos para determinação de sua toxicidade, ações farmacológicas e fisiológicas. Partes da planta como sementes, folhas, rizoma e flores apresentam possibilidade fitoterápica por apresentar em suas evidências científicas as ações antifúngica, antiulcerogênica, relaxante, anti-hipertensiva, antiespasmódica, efeito relaxante do tônus basal e anti-inflamatório (BEZERRA *et al.*, 2000; ALBUQUERQUE; NEVES, 2004).

Mendonça *et al.*, (1991) obtiveram vários resultados em suas pesquisas. Em relação ao extrato hidroalcoólico da *A. zerumbet*, foi verificada dose letal (DL₅₀) em 10g/Kg, enquanto que o extrato aquoso foi praticamente atóxico. Ao se estudar o tempo de indução e duração do sono, obteve-se como resposta o aumento do tempo de sono nos animais. Além disso, outros estudos evidenciaram inibição de acetilcolina, bradicinina, ocitocina, cloreto de bário, diminuição do ritmo cardíaco e pressão arterial, aumento do colesterol do tipo HDL e aumento da TGO e TGP ao ser ingerido o extrato hidroalcoólico (5 g/kg) e chá (15 mL/kg).

Em pesquisas realizadas por Albuquerque e Neves (2004), os rizomas tiveram eficácia no tratamento de diarreia, artrite, úlcera e tosse. Já suas folhas, apresentaram efeitos vermífugos, anti-hipertensivo, atividade relaxante e antiestresse. Recebe também o destaque dessa planta com a finalidade de inibir processos edematosos em até 66%. Um estudo realizado por Leeman *et al.* (2009) sobre o óleo essencial do rizoma da *A. zerumbet* relataram ação anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos com artrite, associadas a modificações no hipocampo no cérebro. Na literatura, também foram encontrados resultados a partir de estudos em ratos, inibindo o edema, sendo tratados com óleos essenciais ou extrato etanólico da planta (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004).

O princípio ativo do terpeno 1,8 cineol é capaz de melhorar a absorção dos medicamentos transdérmicos, pois interagem com os lipídios e queratina, permitindo maior solubilidade aos medicamentos (SAPRA *et al.*, 2008). Além disso, apresentou efeito antiinflamatório, mucolítico de vias aéreas, observando-se ação em monócitos, com inibição de leucotrienos B₄, prostaglandina 2, inibição na produção de TNF, interleucina 1, leucitrieno4 e tromboxano (JUERGENS *et al.*, 1998)

Já o terpeno-4-ol na concentração de 60 nM apresentou atividade relaxante de duodeno, inibindo a sua contração fásica em decorrência do antagonismo de cálcio de forma dose-dependente (NASCIMENTO *et al.*, 2005). Outros efeitos como controle da dor na medula espinhal também são relatados nos estudos de Khalil *et al.* (2004), ao atuarem na redução dos níveis da substância P.

Em pesquisas clínicas, com 21 voluntários, foi observado por Koh (2002) que o processo inflamatório passou a ser inibido pela presença do terpeno-4-ol, 1,8 cineol e α -terpineol. Em 2004, Khalil *et al.*, demonstrou que houve redução do processo inflamatório em 18 voluntários nos tempos de 50, 60 e 70 minutos devido a presença do terpeno-4-ol, 1,8 cineol e α -terpineol e que o terpeno-4-ol quando isolado, apresentou a mesma ação nesses três tempos. Em relação ao tempo de atividade farmacocinética houve semelhante resultado tanto para Koh (2002) como para Khalil *et al.* (2004) com leitura de 1 hora após a aplicação.

Nas pesquisas com *A. zerumbet*, em relação à contração muscular, são citados os seguintes resultados: ação anticolinérgica competitiva que inibe a contração muscular, vasorelaxante por apresentar uma atividade reduzida do tônus simpático, além de moduladora da concentração do cálcio no músculo liso, de forma dose dependente (BEZERRA *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Cândido *et al.* (2013) realizou um estudo sobre a triagem farmacológica comportamental do OEAz de modo a verificar os efeitos de forma sistêmica de sua aplicação em camundongos adultos. Ao analisar as doses 0,5 μ l, 5,5 μ l e 8,3 μ l obteve-se como resultado ambulação diminuída nos primeiros 30 minutos. Além disso, foi evidenciada melhora

significativa na maior dose, embora tenha ocorrido diminuição na intensidade da ambulação quanto maior o tempo de aplicação das doses.

Pesquisas clínicas com OEAz e Ziclague® foram realizadas por Cândido (2010) demonstrando que tanto o OEAz doseado como o Ziclague® foram capazes de modular a espasticidade. As dissertações de mestrado realizadas por Cerqueira (2014) e Cândido (2014) evidenciaram que a utilização do bioproduto em longo prazo mostrou-se eficaz para reverter as alterações na espessura e organização do colágeno causadas pela espasticidade, bem como presença de miofibrilas comportamento neurológico funcional e espaço de endomísio adequados, assemelhando-se ao grupo sadio.

4 CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho da Pesquisa

O presente estudo caracteriza-se como pré-clínico, experimental, prospectivo e intervencional.

4.2 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Biotério da Universidade Tiradentes (UNIT) e nos Laboratórios de Estudos Biológicos e Produtos Naturais (LBPN) e Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural (LMBE) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) de Sergipe (SE).

4.3 Submissão do estudo à Comissão de Ética no Uso de Animais

O estudo foi submetido à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIT e aprovado com protocolo de número 060514 (ANEXO I).

4.4 Fitofármaco

As amostras do fitofármaco Ziclague® foram doadas pela empresa Hebron Farmacêutica, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Ltda, com sede em Pernambuco. O bioproduto foi confeccionado a partir da coleta das folhas verdes da *A. zerumbet*, transportadas em carro climatizado, tendo seu óleo essencial extraído por arraste a vapor com rendimento de 1% e utilização de óleo vegetal como veículo.

Para identificação de sua composição química, o bioproduto foi submetido à uma análise por cromatografia gasosa no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi utilizado um detector de massa (Shimadzu, Japão, QP 2010-plus) operando com energia de ionização de 70 eV com uma massa contida no intervalo de 45-450 Da. Para identificação da constituição química, foi empregada uma coluna capilar DB5 (Agilent Technologies, EUA) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de filmes 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 do 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), como 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 espectro de massa de Adams (2007) como uma ajuda adicional na identificação.

O registro do Ziclague® foi realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicado no Diário Oficial da União (DOU) no dia 5 de maio de 2014, registrado na página 7 do suplemento da Seção 1 sob número 1697 – FITOTERÁPICO, REGISTRO DE MEDICAMENTO 1.1557.0069.002-5 25351207153/2012-85 05/2019 (ANEXO II).

4.5 Animais

Foram utilizados 72 ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com 5 semanas de idade, ambos os sexos e peso entre 150 a 200 gramas, os quais permaneceram em gaiolas de polipropileno padrão, agrupados em número de 3, mantidos em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Na conduta clínica, teve-se o cuidado de realizar massagem abdominal como auxiliadora mecânica no esvaziamento da bexiga e defecação, já que a lesão medular espinhal causa transtornos vesicais e esfinterianos e estas alterações não foram objetivos deste estudo. Assim, essa ação favoreceu o bem-estar fisiológico do animal diante das alterações.

Ao final de cada experimento, os animais foram eutanasiados por câmara de gás e após a coleta do material biológico (músculos gastrocnêmios) foram incinerados no Biotério da referida universidade.

4.6 Procedimento cirúrgico

O modelo de lesão medular utilizado neste estudo foi baseado no experimento de Torres *et al.* (2010) pelo método de compressão. Os animais foram inicialmente

pesados e, em seguida, pré-anestesiados com Cloridrato de Ketamina a 10% (95mg/kg) e anestesiados com Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal.

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

Para exposição do canal medular, foi feita a localização das vértebras T9 e T10 através da palpação e realizada a laminectomia destes seguimentos. Neste momento foi reproduzido o trauma mecânico utilizando um aparelho estereotáxico modificado, confeccionado pelos pesquisadores e composto de uma haste fina de ponta romba (01mm²) com peso acoplado de 70g por 05 minutos.

Posteriormente, suturou-se a camada muscular e a pele com fio 3.0 de poliamida monofilamento absorvível, sendo aplicado antibioticoterapia profilática com Pentabiol a 0,1ml/100g. Ao final da cirurgia, os animais foram acomodados em gaiolas, com água, ração e em ambiente climatizado.

4.7 Grupos experimentais e doses

Os 72 animais foram divididos em 12 grupos, com 2 tempos de tratamento a seguir: 6 grupos experimentais contendo 6 animais em cada grupo tratados por 3 dias (MEYER *et al.*, 2003); e 6 grupos experimentais contendo 6 animais por grupo tratados por 14 dias (LI; BENNET, 2003).

Os grupos pesquisados foram: Sadio, Laminectomia; Controle; e os grupos testes Baclofen (0,15mg/gel), Ziclague Oral (0,05ml/2Kg) e Ziclague® Tópico (0,05ml/2Kg). Os tratamentos foram diários, de segunda à sábado e somente iniciados após 24 horas do procedimento cirúrgico.

No quadro abaixo, segue a organização dos dois tempos de tratamento, com seus respectivos grupos experimentais e doses:

Quadro 1. Organização das fases experimentais com ratos induzidos à lesão medular, N= 72 animais.

Dose	Grupos experimentais		Tempo de tratamento
0,05 ml/2Kg	1	Ziclague® Tópico/ Lesão	3 dias de tratamento
	2	Ziclague Oral/ Lesão	
0,15mg/ gel	3	Baclofen/ Lesão	
-	4	Laminectomia	
-	5	Controle	
-	6	Sadio	
0,05 ml/2Kg	7	Ziclague® Tópico/ Lesão	14 dias de tratamento
	8	Ziclague Oral/ Lesão	
0,15mg/ gel	9	Baclofen/ Lesão	
-	10	Laminectomia	
-	11	Controle	
-	12	Sadio	

4.8 Protocolo de Tratamento

Os animais submetidos ao tratamento com Ziclague Oral, Ziclague® e Baclofen tópicos iniciaram o tratamento diário 24 horas após o procedimento cirúrgico de modo a não potencializar o efeito do anestésico, uma vez que o terpeno-4-ol é indutor do sono e redutor da pressão arterial. Os animais dos grupos Baclofen e Ziclague® tópicos foram submetidos a aplicações tópicas diretamente nos músculos gastrocnêmios de ambas as patas e o grupo Ziclague Oral pelo método de gavagem.

4.9 Protocolo de avaliação

Para os grupos com 3 dias de tratamento, foram realizadas avaliações com 1 e 3 dias. Para os grupos com 14 dias de tratamento, foram realizadas avaliações com 1, 3, 7 e 14 dias. Essas avaliações permitiram a observação dos comprometimentos funcionais e comportamentais nas lesões aguda e subaguda respectivamente, quadro correspondente à

hipotonia e início de hipertonia, semelhantes aos indivíduos acometidos por traumatismo raquimedular. As avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador, amenizando possíveis variações.

Os testes realizados para análise comportamental foram o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e a escala de Ashworth (EA).

O protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (BASSO *et al.*, 1995) utiliza uma escala de avaliação locomotora padronizada. Os itens a serem avaliados são os movimentos das patas, sua coordenação, firmeza e comportamento do tronco. Seus subitens são: movimento do membro posterior, posição do tronco, abdômen, posição da pata, caminhada, posição predominante da pata, instabilidade do corpo e rabo. A escala apresenta 22 escores, variando de 0 (ausência total de movimentos) à 21 (movimentação normal). Para sua realização, o animal é colocado em um campo aberto para que os avaliadores tenham total visualização e avaliem por um período de 2 a 4 minutos (ANEXO III).

Para avaliação do grau de espasticidade, utilizou-se a EAM (HAHM *et al.*, 2015). É composta por 6 escores que variam de 0 a 4, onde 0 indica tônus normal e 4, presença de rigidez em flexão ou extensão (ANEXO IV). Para o presente estudo, além dos graus dessa escala, foi acrescentado o escore -1 para indicar tônus flácido, decorrente do procedimento de lesão medular.

Todos os testes realizados foram filmados para evitar erros nas determinações de seus escores. Após analisados, os valores foram organizados em um banco de dados para melhor visualização dos resultados, sempre levando em consideração a pata com maior acometimento.

4.10 Análise histomorfológica

Para análises histológicas, foi necessário utilizar colorações de hematoxilinaeosina, Picrossírius e Tricrômico de Masson. Os procedimentos histológicos descritos a seguir foram realizados no LMBE do ITP.

Após o 3º e 14 dias, os ratos foram eutanasiados, os gastrocnêmios retirados e embebidos em solução tamponada de formol a 10%. O material biológico passou por um processo de desidratação e clareamento em álcool e xilol por um período total de 6 horas. Posteriormente, fez-se a inclusão em parafina para confecção de 5 secções histológicas seriadas de 5µm de espessura. Para análise histomorfológica do tecido muscular analisou-se as secções histológicas coradas em Hematoxilina-Eosina,

Picrossírius (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009) e Tricrômico de Masson (CALVI *et al.*, 2012).

Para caracterização histopatológica do tecido muscular, as lâminas histológicas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), segundo Albuquerque Júnior *et al.* (2009), onde foram analisadas as seguintes variáveis: miofibrilas, endomísio, perimísio e feixe muscular. As lâminas foram analisadas 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.

Para análise do padrão de neoformação do colágeno, secções histológicas de 5 µm de espessura foram corados pela técnica histoquímica do Picrossírius e analisados sob luz polarizada (ALBUQUERQUE JÚNIOR *et al.*, 2009). Para tanto, foi utilizado um polarizador para luz transmitida (45MM U-POT, Olympus) acoplado a um microscópio trinocular CX31 (Olympus), com sistema de captura de imagens C-70070 WIDE ZOOM (Olympus). Para essa análise descritiva do padrão de formação do colágeno foi analisada as seguintes variáveis: birrefringência (esverdeada ou amareloesverdeada para colágeno tipo III imaturo; e alaranjada ou avermelhada para colágeno tipo I maduro).

Fez-se ainda a mensuração da espessura do colágeno muscular, localizado no perimísio e no endomísio, nas imagens capturadas através do software AxioVision 105 color, expressas em micrômetro a partir das lâminas coradas em Tricrômico de Masson.

4.11 Análise estatística

A tabulação de dados e tabelas foram confeccionadas pelo Programa Microsoft Excel 2010 e mensuração das lâminas pelo AxionVision Release 4.9.1. SE 64. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 6.01. Para as análises de comparações múltiplas foi utilizado o ANOVA ONE WAY (para análise de miofibrilas, endomísio, perimísio e feixe muscular) e TWO WAY (para análise das escalas BBB e EAM) seguido do pós-teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$.

5 REFERÊNCIAS

ADAMS, J. The proteasome: structure, function and role in the cell *Canc Treat Rev* 2003; 29(1): 3-9.

- ALBUQUERQUE, E.S.B.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt e Smith (Zingiberaceae). *Acta Bot Bras* 2004; 18(1).
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L.C.; BARRETO, A.L.S.; PIRES, J. A.; REIS, F.P.; LIMA, S.O.; AMÁLIA, M. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int J Morphol* 2009; 27(4): 1105-1110.
- ALENAZI, B.; QURESHI, A.M.; ALFARAIDY, S.; ALMULLA, A. The importance of full spinal cord screening and assessment of trauma patients involved in motor vehicle accidents – A case report. *J Taibah Uni Med Sci* 2013; 8(3): 183-186.
- ALMEIDA, E.R. *Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos*. São Paulo: Hemus, 1993.
- ANDRADE, D.V. et al. Avaliação epidemiológica dos pacientes com traumatismo raquimedular operados no Hospital Estadual “Professor Carlos da Silva Lacaz”. *Rev Coluna* 2010; 9(1).
- AWAAD, Y.; RIZK, T. Spasticity in children. *J Taibah Univ Med Sci* 2012; 7(2): 53-60.
- AZIMI, H.; KHAKSHURR, A.A.; AGHDASI, I.; FALLAH, T.M.; ABDOLLAHI, M. A review of animal and human studies for management of benign prostatic hyperplasia with natural products: perspective of new pharmacological agents. *Inflamm Allergy Drug Target* 2012; 11(3):207-221.
- BAKHEIT, A.M.O.; FHEODOROFF, K.; MOLTENI, F. Spasticity or reversible muscle hypertonia? *J Rehabil Medical* 2011; 43: 556–557.
- BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995; 12(1): 1-21.
- BATCHELOR, P. E.; TAN, S.; WILLIS, T. E.; PORRITT, M.J.; HOWELLS, D.W. Comparision of inflammation in the brain and spinal cord follow mechanical injury. *J Neurotrauma* 2008; 25: 1217-1225.
- BAUCHET, L.; LONJON, N.; PERRIN, F.E.; GILBERT, C.; PRIVAT, A.; FATTAL, C. Strategies for spinal cord repair after injury: A review of the literature and information. *An of Phys and Rehab Med* 2009, 52(1): 330-351.
- BERTOLDI, A. L. S.; ISRAEL, V.L.; LADEWING, I. O papel da atenção na fisioterapia neurofuncional. *Fisioter Pesqui* 2011; 18(2): 195-200.
- BEZERRA, M. A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; FONTELES, M.C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essencial oil of *Alpinia Speciosa* Schum on rat ileum. *Phytother Res* 2000; 7(14): 549-551.
- BEZERRA, M.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; FONTELES, M.C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. *Phytotherapy Research* 2000; 14(7): 549-451.
- BLACKBURN, M.; VLIET, P.V.; MOCKETT, S.P. Reliability of measuraments obtained with the modified Ashworth scale in the lower extremities of people with stroke. *Phis Ther* 2002; 82(2): 24-35.
- BOFF, S. R. A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo. *Acta fisiátrica* 2008; 15(2): 111-116.
- 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. *Developmental Med Child Neurol* 2001; 43: 314–320.
- BRITO, J.M.X. Incapacidade por traumatismo raquimedular secundário a acidentes de trânsito. *Columna* 2011; 10(3): 175-178.

- CALVI, E.N.C. *et al.* Modelo experimental para o estudo de fibras de colágeno no músculo esquelético. *Acta Cir Bras* 2012; 27(10): 681-686.
- CAMPANINI, I. *et al.* Qual é o risco de usar escala de Ashworth modificada (MAS) para avaliar a espasticidade no tornozelo? *Gait & Postura* 2011; 33:18-19.
- CAMPOS, M.F.; RIBEIRO, A.T.; LISTIK, S.; PEREIRA, C.A.B.; SOBRINHO, J.A.; RAPOPORT, A. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. *Ver Col Bras Cir* 2008; 35(2): 88-93.
- CÂNDIDO, E.A.F. *Utilização do óleo essencial da Alpinia speciosa Schum, Zingiberaceae, no tratamento fisioterapêutico de pacientes com síndrome piramidal* [Tese]. Aracaju: Universidade Federal do Ceará; 2010.
- CÂNDIDO, J.A.F. Análise das alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental pós-lesão medular tratadas com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*. [Dissertação]. Aracaju: Universidade Tiradentes; 2014.
- CÂNDIDO, J.F.; FREITAS, M.M.; SANTOS, F.E.N.; OLIVEIRA, T.V.C.; CÂNDIDO, E.A.F. Análise dos efeitos de forma sistêmica da aplicação dérmica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) em camundongos (*Mus musculus*) adultos *Scire Salutis* 2013; 3(2): 73-83.
- CASTRO-FERREIRA, R.; FONTES-CARVALHO, R.; FALCÃO-PIRES, I.; LEITEMOREIRA, A.F. Papel da titina na modulação da função cardíaca e suas implicações fisiopatológicas. *Arq Bras Cardiol* 2011; 96(4): 332-339.
- CATTERAL, W.A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011; 1-23.
- CHERESH, P., *et al.* Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *BBA Mol Basis Dis* 2013; (1832)7:1028-1040.
- CEREZETTI, C.R.N.; NUNES, G.R.; CORDEIRO, D.R.C.L.; TEDESCO, S. Lesão Medular Traumática e estratégias de enfrentamento: revisão crítica. *Mundo Saúde* 2012; 36(2): 318-326.
- CERQUEIRA, F.L. *Efeitos da cinesioterapia associada ao bioproduto à base do óleo essencial da Alpinia zerumbet sobre o colágeno dos tecidos musculares espásticos de ratos pós-lesão medular* [Dissertação]. Aracaju: Universidade Tiradentes, 2014.
- CHARGÉ, S. B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209-238.
- CHENG, H.; LEDERER, W.J. Calcium Sparks. *Physiol Rev* 2008; 88: 1491-1545.
- CHINELATO, J.C. A; PERPÉTUO, A.M.A.; KRUEGER-BECK, E. Espasticidade – Aspectos neurofisiológicos e musculares no tratamento com toxina botulínica do tipo A. *Rev Neuroc* 2010: 1-6.
- CORREA, A.J.C.; LIMA, C.E.; COSTA, M.C.C.D. *Alpinia zerumbet* B.L. Burt & R.M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. *Rev. Bras de Plantas Med* 2010; 12(1): 113-119.
- CUFF, L.B.S.; FANN, J.R.; BOMBARDIER, C.H.; GRAVES, D.E.; KALPAKJIAN, C.Z. Depression, pain intensity and interference in acute spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj Rehab* 2014; 20(1): 32-39.
- DIETZ, V. Neuronal plasticity after a human spinal cord injury: Positive and negative effects. *Exp Neurol* 2012; 235: 110-115.
- DIETZ, V.; SINKJAER, T. Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics. *Lancet Neurol* 2007; 6(8):725-33.

- DOLAN, E.J.; TATOR, C.H.; ENDRENYI, L. The value of decompression for acute experimental spinal cord compression injury. *J Neurosurg* 1980;53: 749-755.
- ECHVERI, D; FONTANILLA, M.; BUITRAGO, L. El macrófago en enfermedad vascular? Él enemigo oculto? *Cardiol Del Adulto* 2004; 11: 164-173.
- FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999; 49(6): 377-391.
- FERREIRA, L.L.; MARINO, L.H.C.; CAVENAGHI, S. Atuação fisioterapêutica na lesão medular em Unidade de Terapia Intensiva: Uma atualização de literatura. *Rev Neurociênc* 2012; 20(4): 612-617.
- FERREIRA, L.L.; MARINO, L.H.C.; CAVENHAGHI, S. Atuação fisioterapêutica na lesão medular em unidade de terapia intensiva: atualização de literatura. *Rev Neurociênc* 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. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 713-717.
- FRANKEN, M. Flexibilidade: aspectos fisiológicos e fatores limitantes. *Edf Esp* 2010; 15(148): 1-6.
- FRANZOI, A.C. Perfil funcional de locomoção em um grupo de pacientes com lesão medular atendidos em um centro de reabilitação. *Coluna* 2009; 8(4): 401-407.
- FRIDÉN, J.; LIEBER, R. L. Spastic muscle cells are shorter and stiffer than normal cells. *Muscle Nerve* 2003; 27(2): 157-164.
- GASPAR, A.P.; INGHAM, S.J.M.; VIANNA, P.C.P.; SANTOS, F.P.E.; CHAMLIAN, T.R.; PUERTAS, E.B. Avaliação epidemiológica dos pacientes com lesão medular atendidos no Lar de São Francisco. *Acta Fisiátrica* 2003; 10(2):73-7.
- GEROMINI, K.V.N.; RORATTO, F.B.; FERREIRA, F.G.; POLIDO, P.B.; SOUZA, S.G.H.; VALEE, J.S. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. *Arq Ciênc Vet Zool* 2012; 15(2): 127-131.
- GORDON, A.M.H.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiol Rev* 2000; 80(2): 853-924.
- GRACIES, J. M. Pathophysiology of spastic paresis I: Paresis and soft tissue changes. *Muscle Nerve* 2005; 31: 535-551.
- GREIG, C.A.; JONES, D.A. Muscle physiology and contraction. *Surgery* 2013; 31(4): 147-154.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier, 2011.
- GUO, W. CAMPBELL, K.P. Assotiation of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmatic reticulum. *J Biol Chem* 1995; 270(15): 9027-9030.
- GWAK, Y.S.; HULSEBOSCH, C.E. GABA and central neurophatic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacol* 2011; 60: 709-808.
- HEFFERAN, M.P.; FUCHIGAMI, T.; MARSALA, M. Development of baclofen tolerance in a rat model of chronic spasticity and rigidity. *Neurosci Letters* 2006; 403(1): 195-200.
- HERNANDEZ-OCCHOA, E.O.; SCHNEIDER, M.F. Voltage clamp methods fort the study of membrane currents and SR Ca²⁺ release in adult skeletal muscle fibres. *Prog Biophys Mol Biol* 2012; 108: 98-118.
- HYUN, J. K.; KIM, H. Clinical and experimental advances in regeneration of spinal. *J Tissue Eng* 2010:1-20.

- IMPELLIZZERI, D. *et al.* the effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglocone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem Pharmacol* 2012; 83(10): 1413-1426.
- JOUMAA, V.; RASSIER, D.E.; LEONARD, T.R.; HERZOG, W. Passive force enhancement in single myofibrils. *Eur J Physiol* 2007; 455: 367-371.
- JUERGENS, U.R.; STOBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes *ex vivo*. *Eur J Med Res* 1998; 173(9): 407-412.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 2008.
- KARALAKI, M.; FILI, A.P.; KOUTSILIERIS, M. Muscle regeneration: Cellular and molecular events. *In vivo* 2009; 23: 779-796.
- KHALIL, Z.; PEARCE, A.L.; SATKUNANATHAN, N.; STORER, E.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Regulation of Wheal and Flare by Tea Tree Oil: Complementary Human and Rodent Studies. *J Invest Dermatol* 2004; 123(4): 683-690.
- KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e Biologia Celular*. Elsevier, 2004.
- KIM, H.J.; PERLMAN, D.; TOMIC, R. Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2015; 109(6): 661-70.
- KIMURA Y. *et al.* On the constitution of the rhizoma of *Alpinia speciosa* K. Schumann and A. kumatake Makino. *Yakugaku Zasshi* 1966; 86: 1184-1187.
- KOH, K.J.; PEARCE, A.L.; MARSHMAN, G.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *British J Dermatol* 2002; 147(6): 1212-1217.
- KRONBAUER, G. A.; CASTRO, F. A. S. Estruturas elásticas e fadiga muscular. *Rev Bras Cienc Esporte* 2013; 35(2): 503-520.
- LABEIT, S.; KOLMERER, T. Titin: giant protein in charge of muscle ultratructure and elasticity. *Sci* 1995; 270: 293-96.
- LAURINDO, R.D.; GUZEN, F.P.; GUZEN, P.F.B.; LEMES, M.B.L. Tratamento farmacológico e regeneração do Sistema Nervoso Central em situações traumáticas. *Rev Neurocienc* 2009; 17(2): 128-132.
- LEEMAN, S; BERNET, F.; SEQUEIRA, H. Autonomic dysreflexia increases plasma adrenaline level in the chronicspinal cord-injured rat. *Neuroscience letters* 2009; 286(3): 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: 857869.
- LIEBER, R. L.; RUNESSON, E.; EINARSSON, F.; FRIDÉN, J. Inferior mechanical properties of spastic muscle bundles due to hypertrophic but compromised extracellular matrix material. *Muscle Nerve* 2003; 28: 464-471.
- LONJON, N.; PRIVAT, A.; BAUCHET, L.; PERRIN, F.E. Research in acute traumatic spinal cord injuries: progress and prospects. *Orthopedic Muscular Sys* 2012; 81:1-3.
- LUNDY-EKMAN, L. *Neurociência: Fundamentos para reabilitação*. Elsevier, 2004.
- LYTLE, J.M.; CHITTAJALLI, R.; WRATHALL, J.R.; GALLO, V. NG2 cell response in the CNP-EGFP mouse after contusive spinal cord injury. *J List* 2009; 57(3): 270-285.

- MACIEL, B.M.M.; MORFIN, B.M.C. Efectos inmunomoduladores de la célula cebada. *Alergia Asma Immunol* 2009; 18(2): 47-51.
- MACKENZIE, M. J.; SHIZHEN, Y.; MACKO, R.F.; MCLENITHAN, J.C.; MACKO, E. Human genome comparison of paretic and nonparetic vastus lateralis muscle in patients with hemiparetic stroke. *J Rehabil Res Dev* 2008; 45(2): 273–281.
- MASUDA T.; MIZUGUCHI S.; TOMOCHIKA, T.; IRITANI, K.; TAKEDA, Y. Isolation and structure determination of new antioxidative ferulic acid glucoside esters from the rhizome of *Alpinia speciosa*, a Zingiberaceae plant used in okinawan food culture. *J Agricultural Food Chemistry*. 2000; 48(5): 1479-84.
- MATEJA, R.D., GREASER, M.L., TOMBE. P.P. Impact of titin isoform on length dependent activation and cross-bridge cycling kinetics in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(4):804-11.
- MAUGHAN, R.; GLEESON, M. *As bases bioquímicas do desempenho nos esportes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
- MC DONALD, J.W.; SADOWSKY, C. Spinal cord injury. *The Lancet* 2002; 359(9304): 417-425.
- MELLO-SILVA, A.C.C.; BRASIL, V.V.; MINAMISAVA, R.; OLIVEIRA, L.M.A.C.; CORDEIRO, A.B.L. *et al.* Qualidade de vida e trauma psíquico em vítimas da violência por arma de fogo. *Text Context Enf* 2012; 21(3): 558-65.
- MENDONÇA, V.L.M. *et al.* Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 1991.
- MENDONÇA, V.L.M.; OLIVEIRA, C.L.A.; CRAVEIRO, A.A.; RAO, V.S.; FONTELES, M.C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1991; 86(2): 93-7.
- MEYER, F.; VIALLE, L.R.; VIALLE, E.N.; BLEGGI-TORRES, L.F.; RASERA, E.; LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 2003; 18(3): 203-208.
- MILLER, J.B.; CROW, M.T.; STOCKDALE, F.E. Slow and fast myosin heavy chain content defines three types of myotubes in early muscle cell cultures. *J Cell Biol* 1985; 101(1): 1643-1650.
- MOLINA, A.I.; CRISTIANE, AL.F.; FILHO, T.E.P.B. Análise comparativa da avaliação funcional realizada na lesão medular em animais. *Acta Ortop Bras*. 2004; 12(1): 4856.
- NASCIMENTO, N.R.F.; CARDOSO, J.H.L.; LESSA, L.M.A.; RORIZ-FILHO, J.S.; CUNHA, K.M.A.; FONTELES, M.C. Terpinen-4-ol: mechanisms of relation on rabbit duodenum. *J Pharmacol* 2005; 57(4):467-474.
- NASSER, M.E.T.; REDA, M.A.E.H.; AWAD, M.R.; AMIN, I.R. Effect of massed practice and somatosensory stimulation on the upper extremity function in patients with incomplete cervical spinal cord injury. *Alexandria J Med* 2014; 1-8: 189-196.
- NAVES, E. L. M. *Modelagem e simulação do controle da postura ereta humana quasiaestática com reflexos neuromusculares*. [Tese]. Uberlândia: Universidade de Uberlândia; 2006.
- NICHOLLS, J.; SAUNDERS, N. Regeneration of imature mammals spinal Cord after injury. *Trends Neurosci* 1996; 19(6).
- NITRINI, R. *A neurologia que todo médico deve saber*. Atheneu, 2005.
- O'DWYER, N.J.; ADA, L.; NEILSON, P.D. Spasticity and muscle contracture following stroke. *Brain* 1996; 119: 1737–49.

- OLSSON, M. C.; KRUGER, M.; MEYER, L.H.; AHNLUND, L.; GRANSBERG, L.; LINKE, W.A. *et al.* Fibre type-specific increase in passive muscle tension in spinal cord-injured subjects with spasticity. *J Physiol* 2006; 577(1): 339-352.
- ONIFER, S.M.; RABCHEVSKY, A.G.; SCHEFF, S.W. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *Ilar J* 2007; 48(4): 385-395.
- OTTENHEIJM, C. A. C.; WITT, C.C.; STIENEN, G.J.; LABEIT, S.; BEGGS, A.H.; GRANZIER, H. Thin filament length dysregulation contributes to muscle weakness in nemaline myopathy patients with nebulin deficiency *Hum Molec Genet* 2009; 18: 2359-2369.
- PAVAN, K.; MARANGONI, B. E. M. *Arquivo de Neuro-Psiquiatria* 2010; 68(1).
- PEREIRA, C.U.; JESUS, R.M. Epidemiologia do traumatismo raquimedular. *J Bras Neurocirurg* 2011; 22(2): 26-31.
- PÉREZ, K. *et al.* Las tendencias en la incidencia de lesión medular traumática y lesión cerebral traumática en España, 2000-2009. *Anal prev accid* 2012; 46: 37-44.
- PIOVESAN, R.F.; MARTINS, M.D.; FERNANDES, K.P.F.; BUSSADORI, S.K.; SELISTRE-ARAÚJO, H.S.; FERRARI, R.A. I. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. *Fisioter Mov* 2009; 22(2): 211-220.
- PONTÉN, E. M.; STAL, P. S. Decreased capillarization and a shift to fast myosin heavy chain IIx in the biceps brachii muscle from young adults with spastic paresis. *J Neurol Sci* 2007; 15 (253): 25-33.
- POON, P.C.; GUPTA, D.; SCHOICHET, M.S.; TATOR, C.H. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries. *Spine* 2007; 32(25): 2853-2859.
- 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.) *J essential oil Res* 1993; 5(3).
- QUAGLIATO, E.; BANG, G.; BOTELHO, L.A.; GIANINI, M.A.C.; SPOSITO, M.M.M.; LIANZA, S. Espasticidade: Tratamento Medicamentoso. *Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina*, 2006.
- RANATUNGA, K.W. Skeletal muscle stiffness and contracture in children with spastic cerebral palsy. *J Physiol* 2011; 598 (11): 2665.
- REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização da fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Rev Esc Enferm* 2002; 36(3): 282-288.
- RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Effect of duration of acute spinal cord Compression in a new acute cord injury model in rat. *Surg Neurol* 1978; 10(1): 38-43.
- ROY, R.R.; EDGERTON, V. R. Neurobiological perspective of spasticity as occurs after a spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2012; 235:116–122.
- RUTKANSKIS, A.M.R.A.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Utilização De Plantas Medicinais Pelos Acadêmicos da Área da Saúde da Faculdade Assis Gurgacz no Município de Cascavel. *Rev Cultivando Saber* 2009; 2(4): 69-85.
- SADOWSKY, C.; MCDONALD, J.W. Spinal-cord injury. *Lancet* 2002; 359(9304): 417-425.
- SAHRANAVARD, S.; GHAFARI, S.; MOSADDEGH, M. Medicinal plants used in Iranian traditional medicine to treat epilepsy. *Seizure* 2014; 23(5): 328-332.

- SANTOS JÚNIOR, L. *Avaliação do efeito do óleo essencial da Alpinia zerumbet, Zingiberaceae no processo cicatricial após tenotomia parcial no tendão do calcâneo de ratos*. [Dissertação]. Aracaju: Universidade Tiradentes; 2013.
- SANTOS, B.A., ROMAN-CAMPOS, D., CARVALHO, M.S., MIRANDA, F.M.F., CARNEIRO, D.C., CÂNDIDO, E.A.F., et al. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca^{2+} current blockade. *Phytomed*. 2011; 18(1): 539-543.
- SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A.K. Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View. *Am Assoc Pharmaceutical Sci J* 2008; 10(1): 120-132.
- SARTORI, J.; NEUWALD, M.F.; BASTOS, V.H.; SILVA, J.G.; MELLO, M.P.; FREITAS, M.R.G.; et al. Reabilitação física na lesão traumática da medula espinhal: relato de caso. *Rev Neurocienc* 2009; 17(4): 364-70.
- SIRABELLA, D.; DE ANGELIS, L.; BERGHELLA, L. Fontes para reparação do músculo esquelético: a partir de células satélite para a reprogramação. *J Caquexia* 2013; 10: 1000.
- SCHIAFFINO, S.; SANDRI, M.; MURGIA, M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiol* 2007; 22: 269-278.
- SCHOELLER, S.D.; BITENCOURT, R.N.; LEOPARDI, M.T.; PIRES, D.P.; ZANINI, M.T.B. Mudança na vida das pessoas com lesão medular adquirida. *Rev Eletrônica Enferm* 2012; 14(1): 95-103.
- SCHWAB, J.M.; BRETCHER, K.; MUELLER, C.A.; FAILLI, V.; KAPS, H.P.; SCHLUESENER, H.J. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration-an integrative perspective. *Prog Neurobiol* 2006; 78:91-116.
- SCHWAB, M.E.; BARTHOLDI, D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Rev Physiol* 1996; 76(2): 319-370.
- SHI, K. et al. Pathogenesis pathways of idiopathic pulmonary fibrosis in bleomycin-induced lung injury model in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2014; 1(190):113-117.
- SILVA, A. et al. Proposal of a real-time computational tool for the measurement of spasticity in stroke patients. *Biosignals and robotics for better and safer living* 2014; 14.
- SILVA, C.H.O.; ALMEIDA, A.E.R.F.; GOMES, M.G.; SILVA, C.H.O.; RACHILD, M.A.; JUNIOR, D.V. et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2008; 60(3): 641-650.
- SILVA, A.R.A.C.; COSTA, A.G.M.L.; BRITO, CPF. *Diferenças estruturais e funcionais dos canais de cálcio do tipo L*. [Dissertação]. Aracaju: Universidade Tiradentes; 2012.
- SILVA, N.A.; SOUSA, N.; REIS, R.L.; SALGADO, A.J. From basics to clinical: A Comprehensive review on spinal cord injury. *Prog neurobiol* 2014; 114(1): 25-57.
- SINKJAER, T. MAGNUSSEN, I. Passive, intrinsic, and reflex-mediated stiffness in the ankle extensors of hemiplegic patients. *Brain* 1994; 117: 355-63.
- SINKJAER, T.; TOFT, E.; LARSEN, K.; ANDREASSEN, S.; HANSEN, H.J. Non-reflex and reflex mediated ankle joint stiffness in multiple sclerosis patients with spasticity. *Muscle Nerve* 1993; 16: 69-76.
- SISCÃO, M.P.; PEREIRA, C.; ARNAL, R.L.C.; FOSS, M.H.D..A; MARINO, L.H.C. Trauma raquimedular: caracterização em um hospital público. Spinal Cord Injury: characterization. *Arq Ciênc Saúde* 2007; 14(3): 145- 7.
- SMITH, L.R.; et al. Novel transcriptional profile in wrist muscles from cerebral palsy patients. *BMC Medical Genomics*. 2009; 2(44): 10-30.

- SMITH, L.R.; LEE, K.S.; WARD, S.R.; CHAMBERS, H.G.; LIEBER, R.L. Hamstring contractures in children with spastic cerebral palsy result from a stiffer extracellular matrix and increased in vivo sarcomere length. *J Physiol* 2011; 589(10): 2625-39.
- SORIANO, J.G.; CANO-DE-LA-CUERDA, R.; MUNOZ-HELLIN; GUTIÉRREZ, R.; TAYLOR, J.S. Valoración y cuantificación de la espasticidad: revisión de los métodos clínicos, biomecánicos y neurofisiológicos. *Rev Neurologia* 2012; 55 (4): 217-226.
- SOUZA, M.A.S.; PINHAL, R.S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arq Bras Cienc Saude* 2011; 36(1): 48-54.
- STROMAN, P.W.; KINGSSHOTT, C.; SCWAB, J.M.; BOSMA, R.; BROOKS, J.; CADOTTE, D. *et al.* The current state-of-the-art of spinal cord imaging: Applications. *Neuroimage* 2014; 1 (84): 1082-1093.
- SWEENEY, H.; STULL, J.T. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: Implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proc Natl Acad. Sci* 1990; 87: 414-418.
- TAGLIAFERRI F.; COMPAGNONE, C.; KORSIC, M.; SERVADEI, F.; KRAUS, J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir* 2006; 148(3): 255-68.
- TEDESCO, A.P.; MARTINS, J.S.; PANISSON, R.D.N. Tratamento focal da espasticidade com toxina botulínica A na paralisia cerebral GMFCS nível V – Avaliação de efeitos adversos. *Rev Bras Ortop* 2013; 9(4): 359-363.
- TEIVE, H.A.G.; ZONTA, M.; KUMAGAI, Y. Tratamento da espasticidade. *Arq Neuropsiq* 1998; 56(4): 852-858.
- TILTON, A.H. 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, A.E.R.F.; CALDEIRA, F.M.C.; GOMES, M.G.; ALVES, E.G.L.; MELO, E.G. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2010; 62(1): 92-99.
- TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T.L.; SOARES, G.L.; RITTER, M.R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, Southern Brasil. *J Ethnopharmacol* 2012; 139: 155-163
- VASCONCELOS, E.C.L.M.; RIBEIRO, M. Caracterização clínica e das situações de fratura da coluna vertebral no município de Ribeirão Preto, propostas para um programa de prevenção do trauma raquimedular. *Coluna* 2011; 10(1): 40-3.
- VIEIRA, D.A.F.; SCALZO, P.L.; SOUZA, E.S.; MOREIRA, A.G.O. Qualidade de vida em pacientes com Acidente Vascular Cerebral: clínica de fisioterapia. *Rev Neurocienc* 2010; 18(2): 139-144.
- WAGNER, H.; WISENAUER, M. *Fitoterapia – Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas*. Pharmabooks, 2006.
- WANG, H.X.; LI, Q.; HUANG, X.J.; HE, W.; DING, J.; JIA, J.T.; FU, G.; WANG, H.X. *et al.* Neuroprotective potential of fasudil mesylate in brain ischemiareperfusion injury of rats. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29:169–180.
- WANG, L.; DUAN, D.; ZHAO, Z.; TENG, X.; GE, L.; LIU, B.; LU, M. Repair of spinal cord injury by hypoxia-inducible factor-1 α -expressing neural stem cells. *J Med Hypotheses and ideas* 2014; 8: 27-29.

WILMERT, J.L.; MADHOUN, N.M.; COUGHLIN, D.J. Parvalbumin correlates with relaxation rate in the swimming muscle of sheephead and kingfish. *J Exp Biol* 2006; 2: 227-237.

YANG, R.; GUO, L.; SHEN, H. Epidemiologia da lesão medular e fatores de risco para lesões completas em Guangdong, China: um estudo retrospectivo. *Public Livr Sci* 2014; 9(1): 1-50.

YING, Q.L.; WRAY, J.; NICHOLS, J.; BATLE-MORERA, L.; DOBLE, B.; WOODGETT, J.; COHEN, P.; SMITH, A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453(7194): 519-523.

ZUARDI, M.C.; AMARAL, V.A.; BORGES, H.C.; CHAMLIAN, R.; MONTEIRO, V.C.; PRADO, G.F. Eletroestimulação e mobilização articular em crianças com paralisia cerebral e pés equinos. *Rev Neurociên* 2010; 18(3): 328-334.

SUBMISSÃO DO ARTIGO:

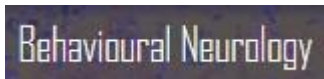
“Pathophysiological phenomena of muscle spasticity: systematic review”

de: **Behavioural Neurology** <amr.yoseph@hindawi.com>
para: mayannammf@gmail.com
data: 18 de janeiro de 2016 12:12
assunto: 2697363: Acknowledging Receipt

Dear Dr. Mayanna Machado Freitas,

This is to inform you that your Review Article titled "Pathophysiological phenomena of muscle spasticity: systematic review" by Mayanna Machado Freitas, Helen Cristina Silveira de Gois, Mayara Tereza Phiton Brito Rocha, Beatriz Benny Sungaila Pereyra, Maysa Machado Freitas, Ana Margarida de Oliveira Martins Guerreiro Calado and Edna Aragão Farias Cândido has been submitted to BehaviouralNeurology by Edna Aragão Farias Cândido, and it has been assigned the manuscript number 2697363.

You will be receiving a copy of all the correspondence regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the Manuscript Tracking System.



ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0953-4180	Behavioural Neurology	INTERDISCIPLINAR	B1



Best regards,

Amr Yoseph
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

6 ARTIGO 1

Fenômenos fisiopatológicos da espasticidade muscular: revisão sistemática

Mayanna Machado Freitas¹, Helen Cristina Silveira de Gois¹, Mayara Tereza Pithon Brito Rocha¹, Beatriz Benny Sungaila Pereyra¹, Ana Margarida De Oliveira Martins Guerreiro Calado², Edna Aragão Farias Cândido^{1, #}.

¹ Universidade Tiradentes, Avenida Murilo Dantas, 300, Farolândia Aracaju – Sergipe – Brasil, 49032-490

² Universidade de Trás-os-Montes and Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801, Vila Real, Portugal

Autor para correspondência: edna_aragao1@globbo.com

Keywords: espasticidade muscular, titina, miosina de cadeia pesada, cálcio, matriz extracelular, colágeno.

RESUMO

A espasticidade é o distúrbio mais comum em lesões congênitas ou adquiridas do sistema nervoso central. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi evidenciar fenômenos fisiopatológicos da espasticidade muscular através de revisão sistemática de acordo com os critérios do Prisma-Statement. Foram utilizados 46 artigos publicados nas bases de dados indexadas no Medline, Lilacs, PubMed e Scielo. Os descritores utilizados foram: *espasticidade*, *muscle spasticity*, *titina*, *titin*, *myosin heavy chain* (MyHC), *calcium* (Ca²⁺), *extracellular matrix*, *colágeno* e *collagen*, pesquisados nas formas isolada e conjugada. Os artigos foram identificados inicialmente por três pesquisadores. Após a seleção inicial, foi realizada uma nova análise por um quarto pesquisador que, de forma independente, determinou os estudos a serem incluídos na revisão. Para a análise estatística, utilizou-se o Software GraphPad Prism 6.01 e o teste Qui-quadrado, considerando significativo $p < 0.05$. Dentre os fenômenos fisiopatológicos existentes, verificou-se que os canais de cálcio do tipo L estão alterados, sendo estes responsáveis pela liberação em excesso do cálcio no sarcoplasma muscular. Como consequência, as ligações cruzadas são potencializadas, produzindo rigidez ou tensão passiva exacerbada. A tensão passiva aumentada induzirá titina alterada, uma vez que a banda-M da titina

apresenta filamentos sensíveis ao Ca^{+2} . Haverá também modificações no colágeno e na matriz extracelular que induzirão maior tensão e rigidez passiva e como resultado, uma hipotrofia muscular. Assim, os músculos espásticos são rígidos e fracos periféricamente e expressam CPM em fibras do tipo IIX. A compreensão dos fenômenos fisiopatológicos da espasticidade pode dar diretrizes para novas estratégias terapêuticas, quer sejam farmacológicas ou fisioterapêuticas, para melhora funcional de indivíduos com espasticidade.

INTRODUÇÃO

A espasticidade é o distúrbio mais comum em lesões congênitas ou adquiridas do sistema nervoso central, que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo [1]. Trata-se de uma desordem motora associada a várias condições clínicas geradas por hipertonia e fraqueza muscular, afetando indivíduos com traumatismo crânio-encefálico (TCE), tumor, acidente vascular cerebral (AVC), traumatismo raquimedular (TRM), paralisias cerebrais (PC) e esclerose múltipla (EM). Sua prevalência é de aproximadamente 25% no TCE, tumor e AVC; 65-78% para TRM e cerca de 85% nas PC e EM [1,2].

A espasticidade, também conhecida como hipertonia espástica, está presente quando a lesão ocorre nos neurônios motores superiores [3] e provoca uma alteração no mecanismo inibitório supra espinal do “reflexo miotático” [4]. Embora existam controvérsias em torno da definição de espasticidade, ela é definida como uma desordem motora caracterizada por aumento velocidade-dependente da resistência dos músculos ao alongamento ou ao movimento passivo, dos reflexos tônicos e pela presença de Babinski [5,6,7,8].

A influência dos reflexos de estiramento muscular exagerado no músculo hipertônico tem efeitos negativos sobre o desempenho motor e qualidade de vida em pacientes com uma lesão do neurônio motor superior [9]. Uma vez que afeta o sistema músculo-esquelético, as consequências da espasticidade têm um efeito direto, ainda que em diferentes graus de gravidade, sobre a vida dos pacientes, prejudicando sua capacidade de realizar atividades da vida diária, causando dor, contraturas e deformidades, os quais dificultam o processo de reabilitação [1].

Atualmente, os estudos se concentram em pesquisas experimentais pré-clínicas e clínicas que tentam elucidar os comprometimentos fisiopatológicos da espasticidade

muscular. Assim, o objetivo geral é construir uma sequência lógica dos fenômenos fisiopatológicos da espasticidade muscular periférica baseada em uma revisão sistemática.

METODOLOGIA

Critérios de inclusão e exclusão

Os estudos foram selecionados a partir dos seguintes critérios de elegibilidade: (1) revisão sistemática; (2) estudos realizados com seres humanos e animais em decorrência da carência de estudos com seres humanos envolvendo o cálcio na espasticidade, importante para entendimento da sua fisiopatologia; (3) estudos experimentais com modificações fisiológicas e ausências estruturais induzidas e (4) estudos apresentando como desfecho principal o conceito de espasticidade, sua incidência na população, as alterações existentes nos canais de cálcio, na titina, no colágeno, na matriz extracelular, nas fibras musculares, na cadeia pesada da miosina e no metabolismo dos músculos espásticos.

Foram excluídos do estudo artigos de: (1) ensaios clínicos que envolvessem apenas estratégias terapêuticas sem envolvimento dos descritores escolhidos, são elas: aplicação de toxina botulínica, administração de medicamentos canabinóides, estimulação elétrica transcutânea e tratamento com órteses e (2) espasticidade hereditária.

Tipo de estudo e estratégia de busca

O estudo foi realizado entre 2014 e 2015 e trata-se de uma Revisão sistemática de acordo com os critérios da declaração Prisma-statement, que consiste em uma lista de 27 itens e um diagrama de fluxo dividido em 4 fases. Os itens têm o objetivo de guiar os autores de revisões sistemáticas sobre as informações que devem ser claramente descritas no manuscrito [10].

O diagrama de fluxo descreve o fluxo de informações através das diferentes fases de uma revisão sistemática. Ele mapeia o número de registros identificados, incluídos, excluídos e as razões para exclusões. Dos 27 itens, 14 foram excluídos por não se aplicarem a revisão, se enquadrando em meta-análises e descrição de fontes de financiamento para a revisão sistemática. Dessa forma os critérios considerados foram: 1- *Title*, 2- *Structured summary*, 3- *Rationale*, 4- *Objectives*, 6- *Eligibility criteria*, 7-

Information sources, 8- Search, 9- Study selection, 14- Synthesis of results , 17- Study selection, 21- Synthesis of results, 24- Summary of evidence, 26- Conclusions.

O estudo foi constituído por artigos publicados nas bases de dados indexadas no Medline (*Literatura Internacional em Ciências da Saúde*), Lilacs (*Literatura LatinoAmericana e do Caribe em Ciências da Saúde*), Scielo (*Scientific Electronic Library Online*) e PubMed (Publicações Médicas), sem restrição de ano de publicação e idioma. Os descritores utilizados foram: *espasticidade, muscle spasticity, titina, titin, myosin heavy chain (MyHC), calcium, extracellular matrix, colágeno e collagen*, pesquisados de forma isolada ou conjugada.

Os artigos foram identificados inicialmente por três pesquisadores que analisaram os títulos e resumos dos estudos listados pelas bases de dados pesquisadas. Quando estes não foram esclarecidos, o conteúdo foi lido na íntegra para que os estudos relevantes não fossem excluídos da revisão.

Após a seleção inicial, uma nova análise mais criteriosa em relação as informações relevantes envolvendo os descritores para melhor entendimento da neurofisiopatologia da espasticidade foi realizada por um quarto pesquisador, cuja função iniciava desde o princípio do processo de escolha.

Extração das informações

Para a extração das informações relevantes dos artigos, foi elaborada uma planilha no programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp, Estados Unidos) na qual foram registrados, à princípio, os seguintes dados: descritores, números de artigos encontrados, selecionados para análise, inacessíveis e artigos utilizados. No segundo momento, os dados registrados na planilha foram: informações gerais (título, autores, ano de publicação do estudo e descritores), números de artigos selecionados para análise e informação de conteúdo.

Análise estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o Software GraphPad Prism 6.01. Esta sendo utilizado o teste Qui-quadrado, verificando-se a frequência do valor estimado em relação ao valor esperado, com os dados apresentados em frequência relativa, e considerado $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas quatro bases de dados pesquisadas foram identificados 11.386 artigos. Destes, 11.207 foram excluídos pelos títulos e resumos, pois além de apresentarem os critérios de exclusão citados anteriormente, estavam relacionados a outras patologias. Sendo assim, 179 artigos foram selecionados para análise, dos quais 125 não estavam disponíveis para o público, totalizando 54 artigos em texto completo para análise, sendo 46 utilizados e 8 excluídos por não apresentarem como desfecho principal as alterações no músculo esquelético espástico.

Dos descritores buscados nos bancos de dados, verificou-se que espasticidade muscular e titina foram os mais encontrados com 9227 e 2067 artigos encontrados, respectivamente, correspondendo a 81,04% ($p<0.001$) e 18,15%. Seguida a análise inicial, apenas 121 e 12 (71,6 % - $p<0.001$ e 7,17%) foram selecionados para nova análise. Porém, após os critérios de inclusão, 10 e 4 (8% - $p<0.001$ e 8,69%, respectivamente) foram realmente utilizados (Tabela 1).

Quando comparados os artigos utilizados, foi encontrado que os descritores espasticidade muscular conjugado com cálcio foram os mais prevalentes com 30,43% ($p<0.001$); só espasticidade muscular 21,74% ($p<0.001$); espasticidade muscular conjugado com colágeno 17,38%; espasticidade muscular conjugado com matriz extracelular 8,69%; e espasticidade muscular conjugado com titina e com cadeia pesada da miosina com 6,52%, cada um (Tabela 2).

O total de artigos selecionados e utilizados nesta revisão sistemática descreve os seguintes achados:

Espasticidade muscular:

Para Olsson et al. [9], os músculos hipertônicos apresentam alterações estruturais, embora os mecanismos não sejam completamente compreendidos. Segundo Fridén; Lieber [11], apesar de não serem completamente elucidadas, torna-se claro que as estruturas musculares alteradas envolvidas são o comprimento do sarcômero, a variação na isoforma titina e colágeno. Além disso, há alteração no tamanho da fibra muscular e uma menor extensão no tecido do músculo espásticos [12].

Dias et al. [13] em concordância com os achados de Fridén e Lieber [11], Mirbagheri et al. [14], Bakheit et al. [8], Marque; Brassat [15], mostraram que apesar do

mecanismo da espasticidade não ser totalmente compreendido, sabe-se que há redução do comprimento dos sarcômeros em série. Em contrapartida, Roy; Edgerton [16] observou as alterações musculares associadas com espasticidade após uma lesão medular, as quais incluem aumento na variabilidade do tamanho das fibras, no percentual de fibras do tipo IIX e no aumento da tensão passiva em todo músculo. Diante das evidências encontradas por Dias et al. [13], a espasticidade pode promover também redução no comprimento e no volume do ventre muscular, aumento do número de fibras do tipo I e aumento de tecido conjuntivo extracelular nos músculos espásticos.

Ito et al. [17] demonstrou na histopatologia da musculatura espástica da paralisia cerebral, usando biópsia do gastrocnêmio obtidas durante operações ortopédicas, que as fibras do tipo I predominam sobre as tipo II e que estas são maiores que as fibras tipo I. Lundy-Ekman [18] e Patten et al. [19] relatam essas transformações tanto em fibras musculares do tipo I como em fibras tipo II, contribuindo assim para a diminuição das atividades funcionais dos pacientes.

Segundo Gao; Zhang [20], em estudo realizado com eletroestimulação no gastrocnêmio, há redução no número e na dimensão de sarcômeros ao longo das fibras dos músculos espásticos nos pacientes com AVC. Estas alterações também foram evidenciadas no estudo de revisão de Rose; McGill [21].

Malaiyar et al. [22] ao estudarem a morfologia dos músculos espásticos, utilizando imagens de ultrassom em duas e três dimensões, demonstraram que o comprimento dos fascículos do músculo gastrocnêmio medial de crianças com paralisia espástica não é diferente quando comparado ao comprimento de fascículos de sujeitos controles.

Cálcio:

Em relação ao cálcio foram encontradas várias citações envolvendo a hiperexcitação e alterações nos canais de cálcio. Bennett et al. [23], Bennett et al. [24] and Bennett et al. [25]; Gorassini et al. [26], Harris et al. [27], Harris et al. [28], Harvey et al. [29], Harvey et al [30], Harvey et al. [31], Li et al. [32], Norton et al. [33], Murray et al. [34] and Rank et al. [35] relatam haver alteração nos motoneurônios após transecção medular de ratos. Essa alteração seria por excitabilidade das vias reflexas espinhais com períodos prolongados de despolarização, causando espasticidade após duas semanas da lesão [23,25], decorrentes das alterações no volume aumentado de sódio e cálcio [32]. A

inatividade do sódio e atividades dos canais do cálcio do tipo L também justifica a fase de choque medular [36].

A hiperatividade dos canais de cálcio do tipo L citada pelos autores acima é completada por Smith et al. [37] que relata regulação inadequada nos canais de cálcio do tipo L alterados nos músculos espásticos, levando aumento desse de forma crônica no retículo sarcoplasmático. A transcrição gênica também foi postulada por Smith [37] em músculos espásticos de crianças com Paralisia Cerebral (PC) juntamente com outras várias expressões gênicas alteradas. As alterações dessas expressões já acontecem na membrana citoplasmática, nos canais de potássio (KCNN3) dependentes de Ca^{2+} , que estão expressos significativamente induzindo despolarização dos canais de tensão $\beta 1$ de cálcio do tipo L voltagem dependente (CACN $\beta 1$) que estão também expressos drasticamente de forma significativa, apesar dos canais de receptores Rianodínicos (RyR1) não estarem alterados. Estas mudanças de transcrição induziram perturbação dos componentes da matriz extracelular (MEC) do músculo espástico, juntamente com a alteração de transcrição gênica envolvendo a miogenese, alterando sua expressão com isoforma de MyHC IIX gerando perfil metabólico específico.

Do ponto de vista fisiológico, Gordon et al.[38] and Cheng; Lederer [39] relatam que o excesso de cálcio causa lesões extensas e alterações nas propriedades contráteis dos músculos, além de aumentar a tensão passiva e reforçar as ligações cruzadas. Como o colágeno é diretamente dependente das ligações cruzadas para a flexibilidade muscular, irá refletir em um músculo rígido.

Ainda do ponto fisiológico, para melhor entendimento das alterações do cálcio no músculo, será abordado o processo normal da contração muscular.

O potencial pós-sináptico do motoneurônio induz, no músculo, influxo intenso de sódio nos túbulos T, de acordo com Prado et al. [40] e Ribeiro et al. [41]. Esse estímulo ativa os túbulos T e os canais rianodínicos (RyR). Os RyR localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) ficam permeável 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, mais especificamente à troponina C, o sítio de ligação da actina para a miosina será liberado, permitindo a produção de tensão e contração muscular [39,42,43].

Ainda seguindo a linha de raciocínio, Rüegg [44], Sweeney; Stull [45], Cheng; Lederer [39] afirmam que a liberação da tensão muscular, induzindo rigidez muscular e

passiva, é produzida pela concentração sustentada de Ca^{+2} ou ausência de ATP no sarcoplasma. Essa atividade encontrada nos diferentes tipos de fibras musculares irá determinar suas expressões gênicas, de acordo com Berchtold et al. [42]. Outro processo de indução actina-miosina é pela fosforilação da cadeia leve da miosina, produzindo aumento da quantidade máxima de tensão do músculo esquelético.

Assim, as ligações cruzadas, segundo Gordon et al. [38] e Cheng; Lederer [39] são influenciadas por mecanismo puramente mecânico, alterando a cinética de liberação de ADP advindo do ATP [46]. A angulação das ligações cruzadas também acarretará geração de força vinculada diretamente ao deslizamento das miofibrilas, diretamente proporcional à tensão passiva a concentração de cálcio, ou seja, quanto mais cálcio mais tensão passiva [38,39].

Esses eventos fisiológicos são reforçados na espasticidade, quando alterações musculares foram relatadas associadas com espasticidade após uma lesão medular, incluindo aumento da tensão passiva em todo músculo. O aumento da tensão passiva também é reforçado por Bakheit et al. [8] diante de lesões de motoneurônios superiores em músculos espásticos. Assim, se vincula diretamente as alterações do cálcio nos canais do tipo L as demais alterações dos músculos espásticos.

Titin

Segundo Fridén; Lieber [11] as variações das isoformas da titina promovem alterações na rigidez muscular, principalmente nos músculos esqueléticos. Ela também representa a descrição de mudança no comprimento do sarcômero em repouso no músculo esquelético espástico.

Foran et al. [47] em seu estudo de revisão relata que não existem demonstrações definitivas de alteração da titina secundariamente à espasticidade, mas sugere que é possível diferenças no sequenciamento de DNA da titina do músculo espástico, possibilitando a expressão de várias isoformas musculares. Portanto, é razoável especular que a isoforma titina pode ser alterada no músculo esquelético em paciente espásticos.

Já os realizados de Smith et al. [48] mostraram que, embora o tamanho da isoforma titina esteja relacionada com a tensão muscular passiva, não foram encontrados achados quanto a sua alteração em isquiotibiais de crianças com paralisia cerebral espástica. Olsson et al. [9] em seu estudo mostrou que o tamanho molecular da proteína titina manteve-se

inalterada em espasticidade ao examinar o músculo vasto lateral de pacientes lesados medulares com espasticidade.

Entretanto, em experimento in vitro sugere haver função da titina sadia, além da tensão passiva, atuando na contração muscular na forma cálcio-dependente dos filamentos actina-miosina do sarcômero. Essa ideia é compartilhada por Joumaa et al. [49] e Kronbauer; Castro [50] quando relatam que a titina sadia é responsável pelo aumento da força após alongamento ativo, resultando em indução da sua rigidez quando o músculo é ativado. A rigidez da titina está relacionada com a tensão de forma cálcio-dependente [51]. Esses dados são sustentados por Ottenheijm et al. [52] os quais demonstraram a influência de miofilamentos ao cálcio na dependência da região M da titina nas pontes cruzadas na regulação da contração muscular gerando força.

Já Mateja et al. [53] afirma que na ausência de titina sadia haverá redução de tensão por diminuição na sensibilidade ao cálcio, afetando a cinética das pontes cruzadas que influenciam o mecanismo básico do comprimento dos músculos estriados.

Cadeia pesada da miosina:

Olsson et al. [9] pesquisaram a fibra muscular e encontraram aumento nas proporções de fibras rápidas que expressam a CPM tipo IIx. As fibras tipo IIx estiveram presentes em proporções maiores do que o normal nos músculos espásticos, ao passo que fibras tipo I foram reduzidas proporcionalmente. Essa expressão é devido ao remodelamento ultraestrutural dos miócitos espásticos. Resultado semelhante encontrado por Póten e Stal [54] em um estudo feito no músculo bíceps braquial em adultos jovens com paralisia espástica também verificou maior expressão das fibras CPM IIx e menor expressão para as fibras CPM I. Outras alterações encontradas por Olsson et al. [9] foram diminuição dos capilares e do volume mitocondrial.

McKenzie et al. [55] em estudo comparativo do músculo vasto lateral parético e não parético, em pacientes com AVC, observou mudança da CPM IIx entre os dois músculos. Verificou também relatos de expressão gênica de isoformas para CPM embrionária do tipo 3 e 8 (MyH3 e MyH8). Essa expressão apresentou aumento de 3,7 para MyH3 e 4,3 vezes para MyH8. Já a diminuição na expressão de genes para a isoforma da cadeia leve da miosina (MLC) ocorreu na miosina de cadeia leve 6B (MYL6B) e miosina reguladora de cadeia leve 3 (MRLC3) na perna hemiparética espástica.

Colágeno

A compreensão dos mecanismos a nível celular e bioquímico sobre a espasticidade deve ser estudada, principalmente no que diz respeito ao tecido conjuntivo. Nesse aspecto, merece destaque o colágeno, por ser uma proteína estrutural responsável pela manutenção da fisiologia muscular [56]. Em seus estudos, feitos em crianças com Paralisia Cerebral, com o objetivo de correlacionar o aumento do colágeno com a gravidade da espasticidade, mostrou que na hipertonía há um acúmulo do teor de colágeno, alterando as propriedades mecânicas do músculo, proporcionando o desenvolvimento de contraturas.

Smith [48] em seu estudo baseado em biópsias dos músculos isquiotibiais de crianças com PC demonstrou existência de alterações dentro da matriz extracelular com o aumento da quantidade de teor de colágeno, que contribuem para o aumento da contratura e rigidez passiva do músculo espástico.

O aumento da rigidez passiva devido as alterações no tecido do colágeno também foi evidenciada por Hufschmidt; Mauritz [57], Sinkjaer et al. [58] e Sinkjaer; Magnussen [59]. O'Dwyer [60] e Gracies [61] relataram que a rigidez intrínseca das fibras musculares e a perda de sarcômeros são fatores contribuintes para o aumento da rigidez passiva. Reforçando esta afirmação, Dietz; Sinkjaer [62] relataram que as alterações secundárias nas propriedades mecânicas da fibra muscular são importantes no mecanismo de espasticidade.

A vinculação da rigidez passiva com o colágeno é melhor entendida pela afirmação ao demonstrarem que a flexibilidade muscular fornecida pelo colágeno está relacionada com as ligações cruzadas. Sendo estes inversamente proporcionais, quanto maior síntese de colágeno novo, menor o número de ligações cruzadas, e como resultado, maior flexibilidade. Reforçando essa afirmação, Gordon et al. [38] e Cheng; Lederer [39] completam que a menor angulação das pontes cruzadas gera força proporcional a tensão passiva de acordo com a concentração do cálcio.

Matriz extracelular:

A rigidez na matriz extracelular em músculos isquiotibiais de crianças com Paralisia Cerebral leva a um aumento da tensão passiva [48]. Em contrapartida, de acordo com os achados de Lieber et al. [12], há diminuição da tensão passiva em feixes de fibras de pacientes hipertônicos.

Lieber et al. [63] descreveu que a proliferação de material de matriz extracelular é decorrente da alta concentração de colágeno, deixando as propriedades mecânicas da matriz extracelular inferiores nos músculos espásticos. As alterações existentes na matriz extracelular são acordadas por Olsson et al. [9].

Bakheit et al. [8] relata que o aumento da resistência passiva se deve a lesão de motoneurônios superior e é reconhecida como um dos fatores de influência para a espasticidade. De acordo com Olsson et al. [9], a resistência passiva na espasticidade, está vinculada ao remodelamento ultra estrutural, expressando cadeia pesada da miosina de fibra do tipo IIx. Indicando assim, um aumento da tensão passiva em músculos espásticos por comprometimento da matriz e das fibras musculares.

A resultante da resistência de força para a extensibilidade é diretamente dependente das condições de elasticidade passiva, viscosidade e forças de inércia. Uma vez que, a resistência do tecido dependente da velocidade de estiramento muscular, induz o aumento do tônus muscular. Essa alteração muscular localizada perifericamente é conhecida como rigidez passiva e decorrente da tensão passiva dos músculos espásticos. Essa alteração muscular localizada perifericamente é conhecida como rigidez passiva e decorrente da tensão passiva dos músculos espásticos Ranatunga [64] expõem a influência no aumento da tensão passiva como resultado das alterações da matriz extracelular e encurtamento do músculo. Tendo essa alteração possibilidade de envolvimento do cálcio em fibras normais e espásticas. Entretanto, Ranatunga [64] afirma o envolvimento da tensão passiva devido às mudanças funcionais e rigidez da matriz extracelular, em vez de alterações intracelulares.

Diante dos achados da revisão sistemática, os fenômenos fisiopatológicos podem se comportar da seguinte forma: o motoneurônio quando lesionados após duas semanas apresenta hiperatividade nos canais de cálcio do tipo L, e estes por sua vez, potencializam os canais de cálcio do tipo L nos músculos estriados, que também se apresentam alterados após a lesão. Com excesso de cálcio no sarcoplasma, serão hiperativados a banda-M da titina, que é sensível aos canais de cálcio, potencializando as ligações cruzadas e induzindo tensão passiva exacerbada. Com tensão passiva e ligações cruzadas aumentadas patologicamente, se terá matriz extracelular e colágeno alterados (rígidos), induzindo em ciclo viciosos tensão passiva e ligações cruzadas aumentadas. Essa característica muscular, principalmente da titina induzirá a expressão da CPM do tipo IIx, que é uma musculatura de pouco metabolismo glicogênico caracterizado por contração

de rápida e fácil fadiga. Assim os músculos espásticos são rígidos e fracos e caracterizam-se como hipotróficos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa se propôs a construir a sequência dos fenômenos fisiopatológicos da espasticidade, pois a sua compreensão dará diretrizes para novas estratégias terapêuticas, quer sejam farmacológicas ou fisioterapêuticas, para melhora do quadro funcional de indivíduos com espasticidade decorrente da síndrome piramidal. Esta por sua vez decorrente de doenças reconhecidas como problemas de saúde pública, a exemplo de AVC, PC, TRM.

Agradecimentos

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. FAPITEC – Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse para a publicação deste artigo.

REFERÊNCIAS

- 1 - PAVAN, K. ; MARANGONI, B.E.M.; SHIMIZU, W.A.L.; MATTOS, S.E.; FERRARI, P.P.; MARTINS, S.R.G.; LIANZA, S. Validation of the Santa Casa Evaluation of Spasticity Scale. *Arq Neuropsiquiatr* 2010; 68(1): 56-61.
- 2 - SORIANO, J.G.; CUERDA, R.C.; HELLÍN, E.M.; GUTIÉRREZ, 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.
- 3 - NITRINI, R. A neurologia que todo médico deve saber. 2 ed. São Paulo: *Atheneu*. 2005.

- 4 - CASALIS, M. E. P. Reabilitação/Espasticidade. 1 ed. São Paulo: *Atheneu*, 1990.
- 5 - LANCE J. S.; FELDMAN, R. J.; YOUNG, R. R.; KOELLA, W. P. Spasticity disordered motor control. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1981; 44: 961.
- 6 - HÄGGLUND, G.; WAGNER, P. Development of spasticity with age in a total population of children with cerebral palsy. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2008; 9: 150.
- 7 - MOURA, R. C. R.; FUKUJIMA, M. M.; AGUIAR, A. S.; FONTES, S. V.; DAUAR, R. F. B.; PRADO, G. F. Predictive factors for spasticity among ischemic stroke patients. *Neuro-Psiquiatria* 2009; 67(4): 1029-1036.
- 8 - BAKHEIT, A. M. O.; FHEODOROFF, KLEMENS; MOLTENI, FRANCO. Spasticity or reversible muscle hypertonia? *J Rehabil Med* 2011; 43: 556–557.
- 9 - OLSSON, M. C.; KRÜGER, M.; MEYER, L. H.; AHNLUND, L.; GRANSBERG, L.; LINKE, W. A.; LARSSON, L. Fibre type-specific increase in passive muscle tension in spinal cord-injured subjects with spasticity. *J Physiol* 2006; 577(1): 339-352.
- 10 – MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D.G. The PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and MetaAnalyses: The PRISMA Statement. *PLOS Med* 2009; 6(6): 1-6.
- 11 – FRIDÉN, J.; LIEBER, R. L. Spastic muscle cells are shorter and stiffer than normal cells. *Muscle Nerve* 2003; 27(2): 157-164.
- 12 - LIEBER, R. L.; RUNESSON, E.; EINARSSON, F.; FRIDÉN, J. Inferior mechanical properties of spastic muscle bundles due to hypertrophic but compromised extracellular matrix material. *Muscle Nerve* 2003; 28: 464-471.
- 13 – DIAS, C.P. et al. – Adaptações morfológicas musculares na espasticidade. *Scientia Medica* 2013; 23(2):102-107.

- 14 MIRBAGHERI, M. M.; ALIBIGLOU, LAILA; THAJCHAYAPONG, MONTAKAN; RYMER, WILLIAM Z. Muscle and reflex changes with varying joint angle in hemiparetic stroke. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* 2008; 5:6.
- 15 - MARQUE, P.; BRASSAT, D. Physiopathologie de la spasticité. *Revue neurologique* 2012; 168: -S36-S44.
- 16 - ROY, R.R.; EDGERTON, V. R. Neurobiological perspective of spasticity as occurs after a spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2012; 235:116–122.
- 17 – ITO, J., ARAKI, A., TANAKA, H. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. *Brain Dev* 1996; 18(4): 299-303.
- 18 - LUNDY-EKMA, N. L. Neurociência: Fundamentos para reabilitação. 2ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier 2004; 125-37.
- 19 - PATTEN C; LEXELL J; BROWN HE. Weakness and strength training in persons with poststroke hemiplegia: Rationale, method and efficacy. *Journal Rehabilitation Research Development* 2004; 41(3): 293-312.
- 20 - GAO, F.; ZHANG, L. Altered contractile properties of the gastrocnemius muscle poststroke. *J Appl Physiol* 2008; 105: 1802–1808, 2008.
- 21 - ROSE, J.; MCGILL, K.C. The motor unit in Cerebral palsy. *Developmental medicine e Child Neurology* 1998; 40: 270-277.
- 22 – MALAIYA, R., MCNEE, A.E.; FRY, N.R. et al. The morphology of the medial gastrocnemius in typically developing children and children with spastic hemiplegic cerebral palsy. *J Electromyogr Kinesiol* 2007; 17(6): 657.

- 23 – 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.
- 24 - BENNETT, D.J., LI, Y., HARVEY, P.J., GORASSINI, M., 2001. Evidence for plateau potentials in tail motoneurons of awake chronic spinal rats with spasticity. *J. Neurophysiol* 2001; 86: 1972–1982.
- 25 BENNETT, D.J., SANELLI, L., COOKE, C.L., HARVEY, P.J., GORASSINI, M.A., Spastic longlasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J. Neurophysiol* 2004; 91(5): 2247-2258.
- 26 - 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.
- 27 - 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; 9(2): 1124–1133.
- 28 - 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 (2): 1040–1051.
- 29 - 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^a; 96(3): 1158–1170.
- 30 - HARVEY, P.J., LI, X., LI, Y., BENNETT, D.J. Endogenous monoamine receptor activation is essential for enabling persistent sodium currents and repetitive firing in rat spinal motoneurons. *J. Neurophysiol* 2006^b; 96(3): 1171– 1186.

- 31 - HARVEY, P.J., LI, Y., LI, X., BENNETT, D.J. Persistent sodium currents and repetitive firing in motoneurons of the sacrocaudal spinal cord of adult rats. *J. Neurophysiol* 2006^c; 96(3): 1141–1157.
- 32 - LI, Y., LI, X., HARVEY, PJ, E BENNETT, DJ (2004). Effects of baclofen on spinal reflexes and persistent inward currents in motoneurons of chronic spinal rats with spasticity. *J. Neurophysiol* 2004; 92(5): 2694-2703.
- 33 - 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(6): 1478–1491.
- 34 MURRAY, K.C., STEPHENS, M.J., BALLOU, E.W., HECKMAN, C.J., BENNETT, D.J. Motoneuron excitability and muscle spasms are regulated by 5HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor activity. *J. Neurophysiol* 2010; 105 (2): 731–738.
- 35 – 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(1): 410–422.
- 36 - LI, Y., E BENNETT, DJ (2003). Persistent sodium and calcium currents plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J. Neurophysiol* 2003; 90(2): 857-869.
- 37 – SMITH, L.R.; PONTÉN, E.; 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.
- 38 – GORDON, A.M.H.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiological Reviews* 2000; 80(2): 853-924.

-
39 – CHENG, H.; LEDERER, W.J. Calcium Sparks. *Physiological Reviews* 2008; 88(1): 1491-1545.

40 – PRADO, M.; REIS, R.; PRADO, V.F.; DE MELLO, M.C.; GOMEZ, M.V.; DE MELLO, F.G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage.

Neurochemistry International 2002; 41(1): 291-9.

41 – RIBEIRO, F.M.; BLACK, S.A.G.; PRADO, V.F.; RYLETT, R.J.; FERGUSON, S.S.G.; PRADO, M.A.M. The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *Journal of Neurochemistry* 2006; 97(1): 1-12.

42 – BERCHTOLD, M.W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. *Physiological Reviews* 2000; 80(3): 1215-1265.

43 – DULHUNTY, A.F.; HAARMANN, C.S.; GREEN, D.; LAVER, D.R.;

BOARD, P.G.; CASAROTO, M.G. Interactions between dihydropyridine

receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2002; 79(1-3): 45-75.

44 – RÜEGG, J.C. The Sarcoplasmic Reticulum: Storage and Release of Calcium. APUD. Calcium in Muscle Activation. Berlin: *Springer-Verlag* 1988; 248(3): 366-381.

45 - SWEENEY, H. LEE; STULL, JAMES T. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: Implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87(1): 414-418.

46 - RATZ, P.H.; SPEICH, J.E. Evidence that actomyosin cross bridges contribute to “passive” tension in detrusor smooth muscle. *J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(6): 1424–1435.

47 - FORAN, J. R. H.; STEINMAN, S.; BARASH, I.; CHAMBERS, H. G.; LIEBER, R. L. Structural and mechanical alterations in spastic skeletal muscle. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2005; 47(10): 713-717.

48 - SMITH LR, LEE KS, WARD SR, et al. Hamstring contractures in children with spastic cerebral palsy result from a stiffer extracellular matrix and increased in vivo sarcomere length. *J Physiol* 2011; 589(10): 2625-39.

49 - JOUMAA, V. et al. Passive force enhancement in single myofibrils. *European Journal of Physiology* 2007; 455(2): 367-371.

50 - KRONBAUER, GLÁUCIA ANDREZA; CASTRO, FLÁVIO ANTÔNIO DE SOUZA. Estruturas elásticas e fadiga muscular. *Rev. Bras. Ciênc. Esporte* 2013; 35(2): 503-520.

51 - LABEIT S; KOLMERER. Titin: giant protein in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 1995; 270(5234): 293-96.

- 52 - OTTENHEIJM, C. A. C., WITT, C. C., STIENEN, G. J., LABEIT, S., BEGGS, A. H., GRANZIER, H. Thin filament length dysregulation contributes to muscle weakness in nemaline myopathy patients with nebulin deficiency. *Hum Molec Genet* 2009; 18(13): 2359-2369.
- 53 – MATEJA, R.D.; GREASER, M.L.; TOMBE, P.P. Impact of titin isoform on length dependent activation and cross-bridge cycling kinetics in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(4):804-11.
- 54 - PONTÉN, E. M.; STAL, B. P. S. Decreased capillarization and a shift to fast myosin heavy chain IIx in the biceps brachii muscle from young adults with spastic paresis. *J Neurol Sci* 2007; 5(1-2): 25-33.
- 55 - MCKENZIE, M. J.; YU, S. ; MACKO, RICHARD, F. ; MCLENITHAN, J.C.; MACKO, C.E.H. Human genome comparison of paretic and nonparetic vastus lateralis muscle in patients with hemiparetic stroke. *J Rehabil Res Dev*. 2008; 45(2): 273–281.
- 56 - BOOTH, CHRISTINE, M.; CORTINA, MARIO. J. F.; THEOLOGIS, T.M.
Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2001; 43: 314–320.
- 57 – HUNFSCHMIDT, A., MAURITZ, K.H. Chronic transformation of muscle in spasticity: A peripheral contribution to increased tone. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 676–85.
- 58 – SINKJAER, T. Magnussen I. Passive, intrinsic, and refl ex-mediated stiff ness in the ankle extensors of hemiplegic patients. *Brain* 1994; 117: 355–63.
- 59 – SINKJAER, T.; TOFT, E.; LARSEN, K.; ANDREASSEN, S.; HANSEN, H.J. Non-refl ex and refl ex mediated ankle joint stiff ness in multiple sclerosis patients with spasticity. *Muscle Nerve* 1993; 16: 69–76.

- 60 - O'DWYER, N.J.; ADA, L.; NEILSON, P.D. Spasticity and muscle contracture following stroke. *Brain* 1996; 119: 1737–49.
- 61 - GRACIES, J. M. Pathophysiology of spastic paresis I: Paresis and soft tissue changes. *Muscle & Nerve* 2005; 31: 535-551.
- 62 – DIETZ, V., SINKJAER, T. Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics. *Lancet Neurol* 2007; 6(8):725-33.
- 63 – LIEBER, R.L.; STEINMAN, S., et al. Structural and functional changes in spastic skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2004; 615–627.
- 64 - RANATUNGA, K.W. Skeletal muscle stiffness and contracture in children with spastic cerebral palsy. *J Physiol* 2011; 598 (11): 2665.

LEGENDA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência dos descritores pesquisados de forma isolada ou conjugada nos bancos de dados Medline (*Literatura Internacional em Ciências da Saúde*), Lilacs (*Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde*), Scielo (*Scientific Electronic Library Online*), e PubMed (Publicações Médicas).

Tabela 2: Prevalência dos descritores conjugados em relação aos artigos utilizados na revisão sistemática.

Tabela 1

Descritores	Artigos encontrados		Artigos selecionados para análises		Artigo sem acesso		Artigos utilizados	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Músculo espástico	9227	81,04^c	129	72,07^c	111	88,8^c	10	21,74^c
Titina	2067	18,15	14	7,82	10	8	4	8,69
Músculo espástico; Titina	9	0,07	3	1,67	0	0	3	6,52
Músculo espástico; Cálcio	47	0,41	14	7,82	0	0	14	30,43^c
Músculo espástico; Cadeia pesada da miosina	10	0,08	3	1,67	0	0	3	6,52
Músculo espástico; Colágeno	18	0,15	12	6,7	4	3,2	8	17,38
Músculo Espástico; Matriz Extracelular	8	0,07	4	2,23	0	0	4	8,69
TOTAL	11386	100	179	100	125	100	46	100

^a $p < 0.05$;

^b $p < 0.01$;

^c $p < 0.001$

Tabela 2

	Descritores conjugados	
	N	%
Músculo espástico; Titina	3	9,37
Músculo espástico; Cálcio	14	43,75^c
Músculo espástico; Cadeia pesada da miosina	3	9,37
Músculo espástico; Colágeno	8	25
Músculo espástico; Matriz extracelular	4	12,5
TOTAL	46	100

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$

SUBMISSÃO DO ARTIGO:

Muscle changes in murine model of spinal cord injury after acute and subacute treatments with Ziclague®

----- Mensagem original -----

Assunto:Planta Medica - PLAMED-2013-04-0343-OP

Data:03/04/2013 18:13

De:claudia.schaerer@unibas.ch

Para:edna_aragao1@globo.com

Dear Dr. Cândido,

This is to acknowledge receipt of your manuscript entitled "Influence of the Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. essential oil in the Kinesiotherapeutic treatment of patients with Pyramidal Syndrome" submitted to Planta Medica. It is receiving full attention. You will be informed in due time on the outcome of the review process.

Your manuscript ID is PLAMED-2013-04-0343-OP.



ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1439-0221	Planta Medica (Internet)	INTERDISCIPLINAR	B1

Official Organ of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)

IMPACT FACTOR 2014: 2.152

Thank you for submitting your manuscript to Planta Medica.

Sincerely,
Dr. Claudia Schaerer
Editorial Office Planta Medica
claudia.schaerer@unibas.ch

7 ARTIGO 2

Alterações musculares em modelo murino de traumatismo raquimedular após tratamentos agudo e subagudo com Ziclague®

Mayanna Machado Freitas¹, Beatriz Benny Sungaila Pereyra¹, Jessica Adriene Santos¹, Rafaela Santos Silva¹, Maria Edilaine Rosário Ferreira¹; Thâmara Mayara dos Santos¹; Francielle Guimarães da Silva¹, Gabrielle Barrozo Novaes¹, Maysa Machado Freitas¹, Rose Nely Pereira Filho¹, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior¹, Ana Margarida de Oliveira Martins Guerreiro Calado² Edna Aragão Farias Cândido¹

Afiliação

¹ Universidade Tiradentes, Sergipe, Brasil

² Universidade de Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

Endereço para correspondência

Prof. Dr^a. Edna Aragão Farias Cândido, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Laboratório de Estudos Biológicos e Produtos Naturais, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brazil. E-mail: edna_aragao1@globo.com
Phone: +55 79 99131 63 22

Resumo

O Traumatismo Raquimedular é responsável por sequelas tais como a espasticidade. O entendimento sobre mecanismo de ação nessa espasticidade gera novas pesquisas com o Ziclague® e este medicamento, derivado do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, modula a espasticidade. Assim, objetivou-se avaliar as alterações musculares em modelo murino de Traumatismo Raquimedular após tratamentos agudo e subagudo com Ziclague®. A pesquisa foi experimental com ratos (Wistar) divididos em seis grupos de seis animais, tratados em 3 e 14 dias, totalizando 72 animais divididos em grupo Ziclague® Tópico (uso tópico), Ziclague Oral (gavagem), Baclofeno (uso tópico), Lesão (submetido à lesão medular sem tratamento), Laminectomia e Sadio (sem serem submetidos a procedimento cirúrgico). Foram realizadas análises comportamentais e avaliação histomorfológica dos músculos gastrocnêmios espásticos. Foi aplicado ANOVA ONE e TWO WAY com pós teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. O grupo Ziclague Oral demonstrou melhores escores de Basso Beattie e Bresnahan em relação aos grupos Baclofeno ($p < 0,01$) em 7 dias e Controle ($p < 0,01$) em 14 dias. Os escores da *Escala de Ashworth* mostraram que em 14 dias, os tônus musculares dos grupos tratados apresentaram diferença significativa em relação aos grupos Sadio e Laminectomia ($p < 0,001$). Na descrição qualitativa, os grupos Controle e Baclofeno apresentaram tecido conjuntivo espesso, enquanto que os grupos Sadio, Laminectomia, Ziclague® Tópico e Ziclague Oral obtiveram tecido conjuntivo delgado. Os grupos Sadio, Ziclague® Tópico e Ziclague Oral apresentaram colágeno frouxo e os grupos Controle e Baclofeno, colágeno denso. Em relação a organização de colágeno, apenas o grupo Controle obteve tecido conjuntivo não modelado. Na análise histomorfológica, o grupo Ziclague Oral apresentou melhores resultados nas variáveis largura de feixe muscular e miofibrilas, seguido do grupo Ziclague® Tópico. Para a largura de endomísio o Ziclague Oral, Ziclague® Tópico e Baclofeno apresentaram menor largura em relação ao Lesão; e na invaginação do colágeno o Ziclague Oral foi menor em relação ao Lesão. No tipo de colágeno, Baclofeno (55,56% e 61,11%) e Ziclague® Tópico (50 e 72,22%) apresentaram moderadamente colágeno do tipo I e III. Já o Ziclague Oral (61,11% e 66,67%) apresentou escasso e moderado colágeno tipo I e III, respectivamente. Assim, provavelmente o Ziclague Oral apresenta melhores ações em relação a massa muscular e menor depósito de colágeno com maior área fibrogênica. No entanto é preciso prolongar mais o tempo de tratamento para melhor elucidação dos resultados.

Palavras-chave

Alpinia zerumbet, Espasticidade muscular, Compressão da medulla espinhal **Abreviações**

A zerumbet: *Alpinia zerumbet*

BBB: Basso, Beattie e Bresnahan

HE: Hematoxilina e Eosina

EAM: Escala de Ashworth Modificada

OEAz: Óleo essencial de *Alpinia zerumbet*

Introdução

Há uma escassez de estudos e comprovações científicas envolvendo tratamentos para espasticidade por meio de plantas medicinais e fitoterápicos. A partir dos levantamentos etnofarmacológicos a medicina tradicional vem sendo resgatada, uma vez que sempre constituiu uma alternativa terapêutica utilizada e culturalmente difundida na busca da promoção da saúde [1]. Dentre as plantas estudadas, tem-se a *Alpinia zerumbet* (*A. zerumbet*), planta herbácea, da família Zingiberaceae, originária da Ásia, encontrada comumente no nordeste brasileiro e conhecida popularmente como “colônia” [2, 3].

Estudos pré-clínicos têm demonstrado ações benéficas relacionadas a atividade antihipertensiva, diurética [2], sedativa [4], antioxidante [5], antiulcerogênica e antifúngica [6] da *A. zerumbet*. Outros efeitos, estes considerados relevantes para o estudo da ação antiespasmódica em músculos estriados, incluem a ação moduladora dos canais de cálcio do tipo L, devido a presença dos princípios ativos 1,8 cineol e terpineno-4-ol capazes de promover o relaxamento muscular; ação anti-inflamatória [3] com diferenciação/remodelação de tecido conjuntivo e influência nos fibroblastos [7], proporcionando redução das alterações de colágeno e normalização do tônus encontrados na hipertonia.

A busca de um tratamento auxiliar na normalização do tônus muscular em pacientes espásticos pode minimizar as consequências do Traumatismo Raquimedular (TRM). Sendo assim, a utilização de um fitofármaco inovador, com potencial para melhorar a funcionalidade destes indivíduos pode gerar impactos econômicos e sociais [8]. Desse modo, o objetivo desta pesquisa foi avaliar as modificações sobre as alterações musculares em modelo murino de traumatismo raquimedular após tratamentos agudo e subagudo com Ziclague®, bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz).

Resultados

A partir da realização de análises macroscópicas e histomorfológicas, foram obtidos resultados dos músculos espásticos relacionados à marcha, instalação da espasticidade, trofismo muscular, contraturas, análises de miofibrilas, feixes musculares, larguras e teor de colágeno no endomísio e perimísio.

A figura 1 demonstra os escores de BBB adequados nos quatro tempos (1, 3, 7 e 14 dias) para os grupos Sadio e Laminectomia em relação aos grupos experimentais ($p < 0,001$). Em relação aos grupos experimentais nos tempos 7 e 14 dias de tratamento, o grupo Ziclague Oral demonstrou melhores escores do BBB em relação ao grupo Baclofeno e em relação ao grupo Controle, respectivamente, de forma significativa ($p < 0,01$). Nesses mesmos períodos os escores da *Escala de Ashworth* mostraram que o tônus muscular dos grupos Sadio e Laminectomia foram diferentes de forma significativa ($p < 0,001$) em todos os tempos dos grupos experimentais.

A análise dos feixes musculares apresentou em 3 dias o grupo Lesão como o grupo com menor diâmetro ($0,61 \pm 0,05$) em relação ao grupo Laminectomia ($p < 0,05$); e Sadio, Ziclague® Tópico e Ziclague Oral ($p < 0,001$). Em 14 dias os grupos experimentais Lesão, Baclofeno, Ziclague® Tópico foram diferentes em relação ao grupo Sadio e Laminectomia ($p < 0,001$). E o grupo Ziclague Oral foi diferente apenas em relação ao grupo Sadio. O grupo Lesão teve seu diâmetro menor ($0,24 \pm 0,03$) que todos os demais grupos (Baclofeno, $p < 0,01$; e Ziclague® Tópico, Ziclague Oral, Laminectomia e Sadio, $p < 0,001$). Seguido pelo grupo Baclofeno, que obteve média $0,55 \pm 0,09$ em relação aos grupos Ziclague® Tópico ($p < 0,05$) e Ziclague Oral ($p < 0,001$). E o grupo Ziclague® Tópico foi menor apenas em relação aos grupos Laminectomia ($p < 0,05$) e Sadio ($p < 0,001$). E o grupo Ziclague Oral foi o que obteve a melhor média do diâmetro das fibras musculares em relação aos grupos experimentais ($0,63 \pm 0,05$) ficando diferente apenas do grupo Sadio ($p < 0,01$) (Figura 2).

Na coloração em HE, o tecido muscular do grupo Sadio se mostrou com células angulosas e núcleos na periferia, sem a presença de células inflamatórias ou estromais (Figura 3A). O colágeno se apresentou frouxo e modelado em epimísio e perimísio. Na coloração em Tricrômico de Masson, o epimísio se apresentou delgado ou espesso (Figura 4A) e o perimísio com frequência mais delgado que espesso, frouxo e modelado

(Figura 5A). A coloração se expressou ora azul ora azul com áreas vermelhas distribuídas em centro e periferias do colágeno (Figuras 4A e 5A).

A análise do grupo Laminectomia realizada na coloração em HE evidenciou tecido muscular com células angulosas e núcleos na periferia. Há presença de células inflamatórias em perimísio, porém sem células estromais (Figura 3B). O colágeno se apresentou delgado/denso e modelado em epimísio (Figura 4B) e no perimísio se apresentou delgado e espesso (Figura 5C). Na coloração em Tricrômico de Masson, o epimísio se apresentou espesso e perimísio com frequência mais delgado que espesso, variando entre modelado e não modelado. A coloração em epimísio se apresentou fracamente azul, enquanto que no perimísio se expressou com frequência maior em vermelho e azul, ora tonalidade normal, ora fraca. As áreas vermelhas estavam distribuídas em centro e periferia do colágeno (Figuras 4B e 5B).

O tecido muscular do grupo Controle na coloração em HE evidenciou células angulosas com núcleos na periferia. Entretanto, foram encontrados núcleos centrais com pouca frequência. Foram observadas células inflamatórias, polimórficas arredondadas, atróficas, necróticas e sem núcleos, além de fibroblastos e fibrócitos na mesma intensidade (Figura 3C). O colágeno se apresentou espesso/denso e não modelado em epimísio e perimísio. Na coloração em Tricrômico de Masson, o epimísio se apresentou espesso/ denso (Figura 4C) e perimísio com frequência mais densa, ambos se apresentaram não modelado (Figura 5C). A coloração se expressou ora azul ora azul com pequenas áreas vermelha distribuídas em centro ou periferia do colágeno.

Na coloração em HE, o tecido muscular do grupo Baclofeno mostrou células angulosas e núcleos na periferia, sem a presença de células inflamatórias e poucos fibroblastos/fibrócitos (Figura 3D). O colágeno se apresentou espesso/denso e modelado em epimísio (Figura 4D), enquanto que no perimísio este não encontrou-se modelado (Figura 5D). Na coloração em Tricrômico de Masson, o epimísio se apresentou espesso e em perimísio denso e não modelado. A coloração se expressou ora azul, ora azul com áreas vermelhas distribuídas em centro e periferias do colágeno.

No grupo Ziclague® Tópico na coloração em HE, o tecido muscular apresentou células angulosas com núcleos periféricos. Porém, alguns núcleos estavam aumentados em tamanho, além de células polimórficas arredondadas. Nota-se pouca presença de células inflamatórias e bastante fibroblastos (sugerindo fusão miooblástica), ambos localizadas em perimísio (Figura 3E). O colágeno se apresentou espesso, frouxo e modelado em epimísio e perimísio. Na coloração em Tricrômico de Masson, o epimísio se apresentou delgado ou espesso (Figura 4E) e no perimísio com frequência mais delgado que espesso, frouxo e modelado (Figura 5E). A coloração se expressou em tonalidade de azul normal ou fraca com várias áreas vermelhas distribuídas em centro e principalmente na periferia do colágeno.

No grupo Ziclague Oral na coloração em HE, evidenciou-se um tecido muscular sem células inflamatórias, com células angulosas e núcleos na periferia. No entanto, há presença de células polimórficas e intensa frequência de fibroblastos (Figura 3F). O colágeno se apresentou denso e modelado em epimísio e delgado/denso/frouxo e modelado em perimísio. Na coloração em Tricrômico de Masson, o epimísio se apresentou delgado/espesso (Figura 4F) e perimísio frequência grande de delgado/espesso e ambos modelado (Figura 5F). A coloração se expressou oras azul, oras azul com intensas áreas vermelha distribuídas na periferia do colágeno.

Ao serem analisadas a largura de miofibrilas, não foram encontradas diferenças significativas em 3 dias de tratamento. Após tratamento subagudo, foram observadas diferenças significativas dos grupos Laminectomia ($p<0.01$), Controle ($p<0.001$), Baclofeno ($p<0.01$) e Ziclague® Tópico ($p<0.05$) em comparação com o grupo Sadio. Dos grupos tratados, apenas o Ziclague Oral obteve diferença significativa com relação ao grupo Controle ($p<0.05$) (Figura 6).

Os resultados da figura 7 mostram a largura de colágeno no endomísio. Em 3 dias de tratamento, não foram obtidas diferenças significativas entre os grupos. Já em 14 dias, nota-se que o grupo Controle apresentou diferença significativa em relação aos grupos Sadio, Laminectomia, Ziclague® tópico e Ziclague oral ($p<0,001$). O teor de colágeno contido na área do endomísio mensurado se apresentou sem diferença significativa em e dias. Entretanto, em 14 dias de tratamento foi verificado mais largo esse teor de

colágeno no grupo Controle quando comparado aos grupos Sadio, Laminectomia, Ziclague® Tópico e Ziclague Oral ($p < 0,001$).

A figura 8 mostra a quantidade de colágeno no perimísio. Com 3 dias de tratamento, não houve diferenças significativas entre os grupos. Em 14 dias, houve aumento da largura do perimísio grupo Lesão em relação ao grupo Sadio, Laminectomia e Ziclague Oral de forma significativa ($p < 0,001$) e Ziclague® Tópico com $p < 0,01$. E em relação ao teor de colágeno ($p < 0,01$) desse mesmo grupo. Já na comparação do teor de colágeno desse grupo (Lesão), o mesmo se apresenta mais largo quando comparado ao grupo Sadio ($p < 0,001$) e Ziclague Oral ($p < 0,05$).

Quanto a presença de colágeno tipo I em 14 dias, este mostrou-se mais predominante no epimísio do grupo Laminectomia e Sadio e no perimísio do grupo Baclofeno e Controle. Já o colágeno tipo III apresentou maior predominância nos grupos Ziclague® Tópico e Ziclague Oral e no perimísio dos grupos Sadio e Ziclague Oral (Tabela 1).

Discussão

O modelo murino de lesão medular utilizado no presente estudo baseou-se nos experimentos de Torres *et al.* [9] a partir de um estereotáxico adaptado com um peso de 70 gramas, resultando em paraplegia bilateral simétrica. Dados semelhantes foram encontrados neste trabalho, onde os grupos submetidos ao método de indução à lesão medular apresentaram escores baixos no teste BBB com diferença significativa em relação aos grupos Sadio e Laminectomia, em ambos os tempos de tratamento propostos. Segundo Evans e Davies [10], a escala BBB é baseada em observação da recuperação funcional do animal pós lesão medular a partir da análise em campo aberto por um determinado período de tempo.

Para comprovar a eficácia do procedimento cirúrgico, um dos grupos experimentais do presente estudo foi submetido à Laminectomia, preservando a manutenção da morfologia da medula espinhal. Quando há um trauma da coluna vertebral sem prejuízos a medula espinhal, dificilmente déficits neurológicos serão desenvolvidos. Assim, nota-se neste trabalho escores elevados do grupo Laminectomia em relação aos

grupos Lesão e tratados. Por outro lado, esperava-se que este grupo apresentasse escores semelhantes aos do grupo Sadio no teste BBB e isso não ocorreu. Resultados semelhantes também foram encontrados na tese de Fukushima [11], onde foi avaliada a concentração de glutamato no líquido, obtendo-se como resultado maior concentração desse neurotransmissor nos grupos Laminectomia e Lesão, justificando assim a redução dos escores do teste BBB do grupo Laminectomia. Assim, a concentração desse neurotransmissor pode ocorrer por estímulo nociceptivo, nesse caso, provocado pela própria intervenção cirúrgica.

Além da análise comportamental, foi realizada avaliação tônica através da EAM, de modo a verificar aumento da resistência passiva nos animais [12]. No presente estudo, a instalação da espasticidade ocorreu a partir do 7º dia com escores acima de 2 e isso foi mantido até o 14º dia. Estes resultados contrapõem aos estudos de Hahm *et al.* [12], onde a hipertonía foi observada somente após 4 semanas de lesão e mantidos até 7 semanas após o procedimento de lesão medular. Em oposição aos achados de Hahm *et al.* [12], Bennett *et al.* [13] demonstraram que a espasticidade tornou-se presente logo após 2 semanas de procedimento cirúrgico de lesão medular.

Outra alteração macroscópica identificada no presente estudo foi a redução da massa muscular, que pode ser explicada pelo mecanismo fisiopatológico da síndrome piramidal. No trauma medular, os motoneurônios superiores encontram-se alterados e há uma redução da transmissão de acetilcolina. Isso causa a redução dos impulsos nervosos que chegam ao músculo, capazes de impedir ou dificultar a contração muscular. Neste trabalho, foi observado redução de feixes musculares dos grupos tratados em relação ao grupo Lesão e esses dados corroboram com os estudos de Lieber *et al.* [14], os quais relatam que músculos espásticos apresentam redução de seus feixes em 40%. Além disso, confirmando os achados da análise macroscópica, as análises histomorfológicas evidenciaram diferença significativa da largura de miofibrilas do grupo Ziclague Oral em relação ao grupo Lesão. Gordon *et al.* [15] e Cheng; Lederer [16] relatam que o excesso de cálcio causa lesões extensas e alterações nas propriedades contráteis dos músculos, além de aumentar a tensão passiva e reforçar as ligações cruzadas. Como o colágeno é uma estrutura que depende diretamente das ligações

cruzadas para a flexibilidade muscular, isso irá refletir em um músculo rígido, fraco e hipotrófico.

Os resultados histomorfológicos levam a uma melhor compreensão do processo de lesão tecidual, uma vez que este apresenta atividades celulares próprias quando há processo regenerativo avançado, como infiltrado inflamatório, núcleo centralizado e atividade fagocitária [17]. Essas características foram evidenciadas na descrição qualitativa do grupo Lesão e isso pode ser explicado pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} livres no sarcoplasma sem o tamponamento pelo retículo sarcoplasmático, ocorrendo assim, maior ativação de enzimas proteolíticas dependentes de Ca^{2+} . Esse comportamento ativa processo inflamatório e ciclos de degeneração e regeneração dessas células [18]. Em contrapartida, nota-se nessa pesquisa que os grupos tratados com Ziclague® Tópico e Ziclague Oral apresentaram menor frequência de células inflamatórias em comparação com o grupo Lesão e esse resultado indica a eficácia do 1,8 cineol, um terpenoide constituinte do OEAz com propriedades anti-inflamatórias [19].

Na presença da espasticidade, achado mais comum da Síndrome Piramidal, o músculo fica hiperativo, por excesso de excitação neuronal, causando alterações nas fibras musculares envolvendo o tecido conjuntivo e a matriz celular [14] resultando em contração muscular inadequada por contraturas. Assim, mesmo sendo uma lesão primária no sistema nervoso central, o sistema nervoso periférico se adapta com achados musculares que potencializam a espasticidade. Em relação aos resultados das análises histomorfológicas, foi possível observar que a variável endomísio apresentou alterações em seu espaço. Segundo Li Bennett [20], no mecanismo da espasticidade ocorre a hiperatividade nos canais de cálcio do tipo L medulares. Smith *et al.* [21] também afirma que os músculos estriados espásticos apresentam expressão aumentada desses canais.

O colágeno, proteína estrutural responsável pela manutenção da fisiologia muscular, é um dos componentes que envolvem a compreensão dos mecanismos a nível celular e bioquímico sobre a hipertonía [22]. A depender da sua quantidade e qualidade encontrada no tecido, ele pode influenciar na contratilidade e elasticidade muscular [23]. Na espasticidade, há o aumento do teor de colágeno, com alterações nas

propriedades mecânicas do músculo, ocasionando o desenvolvimento de contraturas [22]. No presente estudo foi evidenciada melhora significativa da quantidade de colágeno no perimísio e endomísio em 14 dias de tratamento com uso do Ziclague®. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Cerqueira [24], em que foram verificadas modificações e alterações significativas na espessura e organização de colágeno causadas pela espasticidade, porém, após 30 dias de tratamento. Isso significa que o tratamento iniciado precocemente apresenta tanto efeito neuroprotetor quanto minimizador das sequelas da espasticidade.

O aumento da rigidez passiva devido as alterações no tecido do colágeno também foi evidenciada por Hufschmidt e Mauritz [25], Sinkjaer e Magnussen [26] e O'Dwyer [27] e Gracies [28]. Eles relataram que a rigidez intrínseca das fibras musculares e a perda de sarcômeros são fatores contribuintes para o aumento da rigidez passiva. Esses dados corroboram com os resultados do presente estudo por apresentarem quantidade significativa de fibras colágenas do tipo I no grupo Controle e escassez destas fibras de modo significativo no grupo tratado por Ziclague oral semelhante resultado ao grupo sadio. Assim, Dietz e Sinkjaer [29] relataram que as alterações secundárias nas propriedades mecânicas da fibra muscular são importantes no mecanismo de espasticidade, em especial, predominância de fibras de colágeno do tipo I, capazes de reduzir a extensibilidade muscular, além de contribuir para o aumento da contratura e rigidez passiva [30].

O músculo esquelético lesado passa por diversos processos que irão resultar na reparação tecidual, podendo a lesão desencadear inflamação, ativação das células satélites, miogênese, proliferação dos fibroblastos e reorganização do tecido conjuntivo e matriz extracelular. A vinculação da rigidez passiva com o colágeno é melhor entendida pela afirmação de Hadlich *et al.* [31] ao demonstrarem que a flexibilidade muscular fornecida pelo colágeno está relacionada com as ligações cruzadas, sendo estes inversamente proporcionais, pois quanto maior síntese de colágeno novo, menor o número de ligações cruzadas, e como resultado, maior flexibilidade. No presente estudo, houve predominância de colágeno do tipo III no epimísio do grupo Ziclague® Tópico e perimísio dos grupos Sadio e Ziclague Oral. Os músculos esqueléticos desenvolvem uma desnervação que desencadeia o aumento da densidade do tecido conjuntivo e como

resposta acontece a proliferação e síntese de componentes da matriz extracelular, ocorrendo ainda o aumento da síntese de colágeno tipo III e de alguns fibroblastos no endomísio e perimísio, durante o reparo celular [32]. Pelo pouco tempo de tratamento pós-lesão, sugere-se continuidade deste tratamento até a fase crônica, uma vez que o estudo de Cerqueira [33] evidenciou fibras colágenas do tipo III após 30 dias de tratamento, não gerando tensão passiva, tornando o músculo mais flexível [34].

Um das formas de tratamento para espasticidade é o farmacológico, onde incluem-se medicamentos orais, bloqueadores químicos e bomba intratecal com objetivo de normalizar o tônus, favorecendo maior funcionalidade aos indivíduos [35]. O presente estudo utilizou como um dos grupos experimentais o tratamento com Baclofeno. Porém, de acordo com Hefferon *et al.* [36], a modulação da espasticidade com uso do Baclofeno acontece somente na fase inicial. Deste modo, os escores positivos do grupo Baclofeno apresentados neste estudo não significam necessariamente melhora progressiva da hipertonía mediante tratamento contínuo. Além disso, este fármaco apresenta contra-indicações e efeitos colaterais como alucinações, hipotensão ortostática e alterações oftalmológicas e com o uso deste medicamento, deve-se frequentemente avaliar função renal e hepática, como forma de prevenção de lesões nestes órgãos [37].

A proposta terapêutica inovadora do presente estudo foi a utilização do Ziclague®, fitofármaco derivado do OEAz. Estudos evidenciaram reações adversas menos invasivas, identificadas como hipotensora e diurética a partir do uso de extrato aquoso e indutor no tempo e duração do sono na dose 10 g/kg de extrato hidroalcoólico [38]. Em estudo realizado por Loz e Graça [39], ao ser utilizada menor dosagem do OEAz em 12 indivíduos hipertensos espásticos, obteve-se como resultado uma diminuição apenas da pressão sistólica sem causar hipotensão ou nenhuma alteração de pressão arterial sistêmica [40]. Desta forma, a dose utilizada do Ziclague® neste estudo não haveria contra-indicação, já que essa dosagem menor não é capaz de promover efeito hipotensor.

Estudos prévios com OEAz e Ziclague® realizadas por Cândido [40]; Cândido e Xavier-Filho [41] e Maia et al. [42] demonstraram que o OEAz na concentração de 33% foi capaz de modular a espasticidade. Nas dissertações de mestrado utilizando o Ziclague®, realizadas por Cerqueira [33] e Cândido [43] evidenciaram que a utilização

do fitoterápico em longo prazo mostrou-se eficaz para reverter as alterações causadas pela espasticidade, bem como comportamento neurológico funcional e espaço de perimísio e endomísio adequados, assemelhando-se ao grupo Sadio. No presente estudo, também foi obtida melhora significativa nas variáveis larguras do colágeno em endomísio e perimísio, sendo a via de administração oral mais eficaz para o tratamento.

Cândido e Xavier-Filho [41], utilizaram em estudo recente, o fitofármaco baseado na *Alpinia Zerumbet* em crianças com paralisia cerebral espásticas e constataram após um mês de tratamento, melhora da tensão passiva e motricidade funcional. Com a redução da espasticidade, a flexibilidade muscular é favorecida, minimizando risco de instalações de contraturas neuromiogênicas e consequentemente ganho funcional em atividades e marcha de indivíduos com este tipo de acometimento [44].

Com este estudo, os grupos Ziclague® Tópico e Ziclague Oral mostraram eficácia na aceleração da recuperação funcional motora após lesão medular em ratos. Foi verificado também que o grupo Ziclague Oral apresentou-se melhor em relação aos demais grupos experimentais e ao grupo Controle, por vezes, assemelhando-se ao grupo Sadio em relação às variáveis larguras e preenchimento de colágeno em endomísio e perimísio. Assim, evidenciou-se que o tratamento aplicado imediatamente após a lesão medular traz efeitos benéficos na sequela da espasticidade, favorecendo menor rigidez e maior flexibilidade ao tecido muscular. Entretanto, faz-se necessário o prolongamento do tratamento até a fase crônica de modo minimizar a hipertonia, elucidando melhor as ações do Ziclague®.

Materiais e Métodos

Desenho da Pesquisa

Estudo caracterizado como pré-clínico, experimental e intervencional.

Submissão do Estudo à Comissão de Ética no Uso de Animais

Pesquisa submetida à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes (UNIT) e aprovado com protocolo de número 060514.

Fitofármaco

O bioproduto foi confeccionado a partir da coleta das folhas verdes da *Alpinia zerumbet*, tendo seu óleo essencial extraído por arraste a vapor com rendimento de 1% e utilização de óleo vegetal como veículo.

Para identificação de sua composição química, o bioproduto foi submetido à uma análise por cromatografia gasosa no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi utilizado um detector de massa (Shimadzu, Japão, QP 2010plus) operando com energia de ionização de 70 eV com uma massa contida no intervalo de 45-450 Da. Para identificação da constituição química, foi empregada uma coluna capilar DB5 (Agilent Technologies, EUA) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de filmes 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 do 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), como 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 espectro de massa de Adams (2007) como uma ajuda adicional na identificação.

Animais

Foram utilizados 72 ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com 5 semanas de idade, ambos os sexos e peso entre 150 a 200 gramas, os quais permaneceram em gaiolas de polipropileno padrão, agrupados em número de 3, mantidos em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Ao final de cada experimento, os músculos gastrocnêmicos foram retirados e embebidos em formol tamponado a 70%, os animais foram sacrificados por câmara de gás e posteriormente incinerados no Biotério da referida universidade.

Procedimento cirúrgico

O modelo de lesão medular utilizado neste estudo foi baseado no experimento de Torres *et al.* (2010), a partir da utilização de um estereotáxico modificado, confeccionado pelos pesquisadores e composto de uma haste fina de ponta romba (01mm²) com peso acoplado de 70g por 05 minutos.

Grupos experimentais, doses e protocolo de tratamento

Os 72 animais foram divididos em 12 grupos, com 2 tempos de tratamento a seguir: 6 grupos experimentais contendo 6 animais em cada grupo tratados por 3 dias; e 6 grupos experimentais contendo 6 animais por grupo tratados por 14 dias. Os grupos pesquisados foram:

- Grupo Ziclague® Tópico: aplicação do fitofármaco Ziclague® com dose 0,05ml/2Kg, dividido igualmente em ambas as patas traseiras, aplicado por via dérmica nas panturrilhas;
- Grupo Ziclague Oral: aplicação do fitofármaco Ziclague® com dose 0,05ml/2Kg, via gavagem;
- Grupo Baclofeno: aplicação do Baclofeno com dose 0,15 mg/gel dividido igualmente em ambas as patas traseiras, aplicado por via dérmica nas panturrilhas;
- Grupo Lesão: sem nenhum tipo de tratamento;
- Grupo Laminectomia: sem tratamento, tendo sido realizada a Laminectomia, porém sem lesão medular.
- Grupo Sadio: sem realização de Laminectomia e sem tratamento.

Os animais submetidos ao tratamento com Ziclague® Tópico, Ziclague Oral e Baclofeno iniciaram o tratamento diário 24 horas após o procedimento cirúrgico.

Protocolo de avaliação

Para os grupos com 3 dias de tratamento, foram realizadas avaliações com 24 horas, 1 e

3 dias. Para os grupos com 14 dias de tratamento, foram realizadas avaliações com 1, 3, 7 e 14 dias. Essas avaliações permitiram a observação dos comprometimentos funcionais e comportamentais nas lesões aguda e subaguda respectivamente, quadro correspondente à hipotonia e início de hipertonia, semelhantes aos indivíduos acometidos por traumatismo raquimedular. As avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador, amenizando possíveis variações.

Os testes realizados para análise comportamental foram o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e a escala de Ashworth (EA).

O protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (BASSO *et al.*, 1995) utiliza uma escala de avaliação locomotora padronizada. Os itens a serem avaliados são os movimentos das patas, sua coordenação, firmeza e comportamento do tronco. Seus subitens são: movimento do membro posterior, posição do tronco, abdômen, posição da pata, caminhada, posição predominante da pata, instabilidade do corpo e rabo. O BBB apresenta 22 escores, variando de 0 (ausência total de movimentos) à 21 (movimentação normal). Para sua realização, o animal é colocado em um campo aberto para que os avaliadores tenham total visualização e avaliem por um período de 2 a 4 minutos.

Para avaliação do grau de espasticidade, utilizou-se a Escala de Ashworth modificada. É composta por 6 escores que variam de 0 a 4, onde 0 indica tônus normal e 4, presença de rigidez em flexão ou extensão. Para o presente estudo, além dos graus dessa escala, foi acrescentado o escore -1 para indicar tônus flácido, decorrente do procedimento de lesão medular.

Todos os testes realizados foram filmados para evitar erros nas determinações de seus escores. Após analisados, os valores foram organizados em um banco de dados para melhor visualização dos resultados, sempre levando em consideração a pata com maior acometimento.

Análise histomorfológicas

Após o 3º e 14º DPO's, os ratos foram eutanasiados e os gastrocnêmios retirados e embebidos em formol tamponado a 10%. O material biológico passou por um processo de desidratação e clareamento em álcool e xilol por um período total de 6 horas, sendo

três imersões de uma hora em cada produto. Posteriormente, fez-se a inclusão em parafina para confecção de 5 secções histológicas seriadas de 5µm de espessura, separadas entre si por uma distância de 10µm. Para análise histomorfológica do tecido muscular analisou-se as secções histológicas coradas em Hematoxilina-Eosina, Picrossírius e Tricrômico de Masson.

Para caracterização histopatológica do tecido muscular, as lâminas histológicas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), segundo Albuquerque Júnior et al. (2009), onde foram analisadas as seguintes variáveis: miofibrilas, endomísio, perimísio e feixe muscular. As lâminas foram analisadas 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.

Para análise do padrão de neoformação do colágeno, secções histológicas de 5 µm de espessura foram corados pela técnica histoquímica do Picrossírius e analisados sob luz polarizada (ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., 2009). Para tanto, foi utilizado um polarizador para luz transmitida (45MM U-POT, Olympus) acoplado a um microscópio trinocular CX31 (Olympus), com sistema de captura de imagens C-70070 WIDE ZOOM (Olympus). Para essa análise descritiva do padrão de formação do colágeno foi analisada a variável birrefringência (esverdeada ou amarelo-esverdeada para colágeno tipo III imaturo; e alaranjada ou avermelhada para colágeno tipo I maduro).

Fez-se ainda a mensuração da espessura do colágeno muscular, localizado no perimísio e no endomísio, nas imagens capturadas através do software AxioVision 105 color, expressas em micrômetro.

Análise estatística

A tabulação de dados e tabelas foram confeccionadas pelo Programa Microsoft Excel 2010 e mensuração das lâminas pelo AxionVision Release 4.9.1. SE 64. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 6.01. Para as análises de comparações múltiplas foi utilizado o ANOVA ONE WAY e TWO WAY seguido do post-teste Tukey e entre as variáveis qualitativas o Qui-quadrado, considerando significativo $p < 0,05$.

Agradecimentos

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. FAPITEC – Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

References

- ¹ Sahranavard S, Ghafari S, Mosaddegh M. Medicinal plants used in Iranian traditional medicine to treat epilepsy. *Seizure* 2014; 23: 328-332.
- ² Correa AJC, Lima CE, Costa MCCD. *Alpinia zerumbet* B.L. Burt & R.M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. *Rev Bras Plantas Med* 2010; 12: 113-119.
- ³ Santos BA, Roman-Campos D, Carvalho MS, Miranda FMF, Carneiro DC, Cândido EAF, Filho LX, Cruz JS, Gondim AN. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca²⁺ current blockade. *Phytomed* 2011; 18: 539-543.
- ⁴ Mendonça VLM, Oliveira CLA, Craveiro AA, RAO VS, Fonteles MC. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 93-97.
- ⁵ Masuda T, Mizuguchi S, Tomochika T, Iritani K, Takeda Y. Isolation and structure determination of new antioxidative ferulic acid glucoside esters from the rhizome of *Alpinia speciosa*, a Zingiberaceae plant used in okinawan food culture. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1479-1484.
- ⁶ Prudent D, Perineau F, Bessiere JM, Michel G, Bravo R. Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic, properties of the essential oil of the atoumau from Martinique (*Alpinia speciosa* K. Schum.). *Rev Bras Farmacogn* 2009; 19: 697-701.

- ⁷ Santos Júnior L. Avaliação do efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, Zingiberaceae no processo cicatricial após tenotomia parcial no tendão do calcâneo de ratos [dissertation]. Universidade Tiradentes; 2013.
- ⁸ Schmidt BJ, Papin JA, Musante CJ. Mechanistic systems modeling to guide drug discovery and development. *Discov Droga Today* 2013; 18: 116-127.
- ⁹ Torres BBJ, Silva CMO, Almeida AERF, Caldeira FMC, Gomes MG, Alves EGL, Melo, EG. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2010; 62: 92-99.
- ¹⁰ Evans RM, Davies M. ScoreCentre: A computer program to assist with collection and calculation of BBB locomotor scale data. *J Neurosci Methods*. 2010; 194: 102-107.
- ¹¹ Fukushima FB. Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol e do etomidato em ratos submetidos ao trauma medular espinal [dissertation]. Sergipe: Escola Veterinária da UFMG; 2012.
- ¹² Hahm SC, Yoon YW, Kim, J. High-Frequency transcutaneous electrical nerve stimulation alleviates spasticity after spinal contusion by inhibiting activated microglia in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 2015; 29: 370-381.
- ¹³ Bennet DJ, Sanelli L, Cooke CL, Harvey PJ, Gorassini MA. Spastic longlasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J Neurophysiol* 2004; 91: 2247– 2258.
- ¹⁴ Lieber RL, Runesson E, Einarsson F, Fridén J. Inferior mechanical properties of spastic muscle bundles due to hypertrophic but compromised extracellular matrix material. *Muscle Nerve* 2003; 28: 464-471.
- ¹⁵ Gordon AMH, Homsher E, Regnier M. Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiol Rev* 2000; 80: 853-924.
- ¹⁶ Cheng H, Lederer WJ. Calcium Sparks. *Physiol Rev* 2008; 88: 1491-1545.
- ¹⁷ Grounds MD, Torrisi J. Anti- TNFalpha (remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *J Faseb* 2004; 18: 676-682.

- ¹⁸ Alderton JM, Steinhardt RA. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 2000; 13: 9452-9460.
- ¹⁹ Bastos JLN, Lizarelli RFZ, Parizotto NA. Comparative study of laser and LED systems of low intensity applied to tendo healing. *Laser Physics* 2009; 19: 1925-1931.
- ²⁰ Li YE, Bennet DJ. Sodium and calcium currents persistent potential causes plateau in spinal motor neurons of rats chronic. *J Neurophysiol* 2003; 90: 857-869.
- ²¹ Smith LR, Póten E, Hedstrom Y, Ward SR, Chambers HG, Subramaniam S. Novel transcriptional profile in wrist muscles from cerebral palsy patients. *BMC Medical Genomics* 2009; 2: 1-16.
- ²² Booth CM, Cortina-Borja MJ, Theologis TN. Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. *Med Child Neurol* 2001; 43: 314-320.
- ²³ Fridén J, Lieber RL. Spastic muscle cells are shorter and stiffer than normal cells. *Muscle Nerve* 2003; 27: 157-164.
- ²⁴ Wood LK, Kayupov E, Gumucio JP, Mendias CL, Claflin DR, Brooks SV. Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. *J Appl Physiol* 2014; 117: 363-369.
- ²⁵ Hunfschmidt A, Mauritz KH. Chronic transformation of muscle in spasticity: A peripheral contribution to increased tone. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 676-685.
- ²⁶ Sinkjaer T, Magnussen I. Passive, intrinsic, and reflex-mediated stiffness in the ankle extensors of hemiplegic patients. *Brain* 1994; 117: 355-363.
- ²⁷ O'Dwyer NJ, Ada L, Neilson PD. Spasticity and muscle contracture following stroke. *Brain* 1996; 119: 1737-1749.
- ²⁸ Gracies JM. Pathophysiology of spastic paresis I: Paresis and soft tissue changes. *Muscle and Nerve* 2005; 31: 535-551.

- ²⁹ Dietz V, Sinkjaer T. Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics. *Lancet Neurol* 2007; 6:725-733.
- ³⁰ Smith LR, Lee KS, Ward SR, Chambers HG, Lieber RL. Hamstring contractures in children with spastic cerebral palsy result from a stiffer extracellular matrix and increased in vivo sarcomere length. *J Physiol* 2011; 589: 2625-2639.
- ³¹ Hadlich JC, Morales DC, Silveira AC, Oliveira HN, Chardulo LAL. Efeitos do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. *Acta Sci Anim Sci* 2006; 28: 57-62.
- ³² Minamoto VB. Efeitos da desnervação do músculo esquelético: uma revisão. *Fisiot Mov* 2007; 20:63-69.
- ³³ Cerqueira FL. Efeitos da cinesioterapia associada ao bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* sobre o colágeno dos tecidos musculares espásticos de ratos pós-lesão medular [Dissertation]. Sergipe: Universidade Tiradentes; 2015.
- ³⁴ Shrier I. Does stretching improve performance? A systematic and critical review of the literature. *Clin J Sport Med* 2004; 14: 267-273.
- ³⁵ Brashear A, Lambeth K. Spasticity. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular. MS; 2012.
- ³⁶ Hefferon MP, Fuchigami T, Marsala M. Development of baclofen tolerance in a rat model of chronic spasticity and rigidity. *Neurosci Letters* 2006; 403: 195-200.
- ³⁷ Patel DR, Soyode O. Pharmacologic interventions for reducing spasticity in cerebral palsy. *Indian J Pediatr* 2005; 72: 869-872.
- ³⁸ Mendonça VLM, Oliveira CLA, Craveiro AA, Rao VS, Fonteles MC. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Mem Inst Osw Cruz* 1991; 86: 9397.
- ³⁹ Cândido EAF, Maia MON, Melo LA. A influência do óleo essencial *Alpinia speciosa* Schum, Zingiberaceae no comportamento da pressão arterial sistêmica em pacientes com Acidente Vascular Cerebral [Dissertation]. Sergipe: Universidade Tiradentes; 2010.

- ⁴⁰ *Cândido EAF*. Utilização do óleo essencial da *Alpinia speciosa* Schum, Zingiberaceae, no tratamento fisioterapêutico de pacientes com síndrome piramidal [Dissertation]. Sergipe: Universidade Tiradentes; 2010.
- ⁴¹ *Cândido EAF, 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: 110-115.
- ⁴² *Maia MON*. Efeitos do óleo essencial *Alpinia speciosa* SCHUM. Zingiberaceae no sistema nervoso central e muscular [Dissertation]. Sergipe: Universidade Tiradentes; 2011.
- ⁴³ *Cândido, JF*. Análise das alterações histopatológicas do músculo espástico em modelo experimental pós-lesão medular tratadas com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* [Dissertation]. Sergipe: Universidade Tiradentes; 2015.
- ⁴⁴ *Vieira DAF, Scalzo PL, Souza ES, Moreira AGO*. Qualidade de vida em pacientes com Acidente Vascular Cerebral: clínica de fisioterapia. *Rev Neurosci* 2010; 18: 139144.

Legendas para figuras

Fig. 1 Escores do BBB e *Escala de Ashworth* dos grupos tratados ou não com Ziclague Tópico® e Oral em modelo murino de lesão medular.

Fig. 2 Média da largura dos feixes musculares espásticos em cortes transversais lido em micrômetros (n = 06, por grupo), tratados em até 14 dias após lesão medular em murinos com uso do medicamento Baclofeno, fitofármaco Ziclague® e seus Controles. ANOVA ONE WAY com pós-teste de Tukey; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fig. 3 (A, B, C, D, E and F) Corte transversal em grupo Sadio, Laminectomia, Lesão, Baclofeno, Ziclague Tópico e Ziclague Oral de músculos espásticos tratados em 14 dias após lesão medular em HE (400x). Nos grupos A e B são encontradas células angulosas com núcleos periféricos. Os grupos C, D, E e F observa-se macrófagos, fibroblastos e/ou fibrócitos.

Fig. 4 (A, B, C, D, E and F) Epimísio em grupo Sadio, Laminectomia, Lesão, Baclofeno, Ziclague Tópico e Ziclague Oral de músculos tratados em 14 dias após lesão medular em Tricrômico de Masson (40x). Nos grupos A, B, C, D, E e F observa-se colágeno total espesso ou delgado em azul com áreas em coloração vermelha distribuídas em várias áreas desse colágeno.

Fig. 5 Perimísio em grupo Sadio, Laminectomia, Lesão, Baclofeno, Ziclague Tópico e Ziclague Oral de músculos tratados em 14 dias após lesão medular em Tricrômico de Masson (40x). Nos grupos A, B, C, D, E e F observa-se colágeno total espesso ou delgado em azul com áreas em coloração vermelha distribuídas em várias áreas desse colágeno.

Fig. 6 Média da largura das miofibrilas espásticas em cortes transversais lido em micrômetros (n = 06, por grupo), tratados em até 14 dias após lesão medular em murinos com uso do medicamento Baclofeno, fitofármaco Ziclague® e seus Controles. ANOVA ONE WAY com pós-teste de Tukey; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fig 7 Média e desvio-padrão da largura do colágeno em endomísio de músculos espásticos em modelo murino tratados com Ziclague® por via tópica e oral. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ANOVA ONE-WAY com pós-teste Tukey para média de espessura de endomísio e invaginação de colágeno.

Fig. 8 Média e desvio-padrão da largura do colágeno e perimísio de músculos espásticos em modelo murino tratados com Ziclague® por via tópica e oral. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ANOVA ONE-WAY com pós-teste Tukey para média de espessura de perimísio e invaginação de colágeno.

Table 1: Frequência de tipos de colágenos em quadrantes de lâminas em epimísio e perimísio de músculos espásticos em modelo murino tratados ou não com Ziclague® por via tópica e oral.

Fig. 1

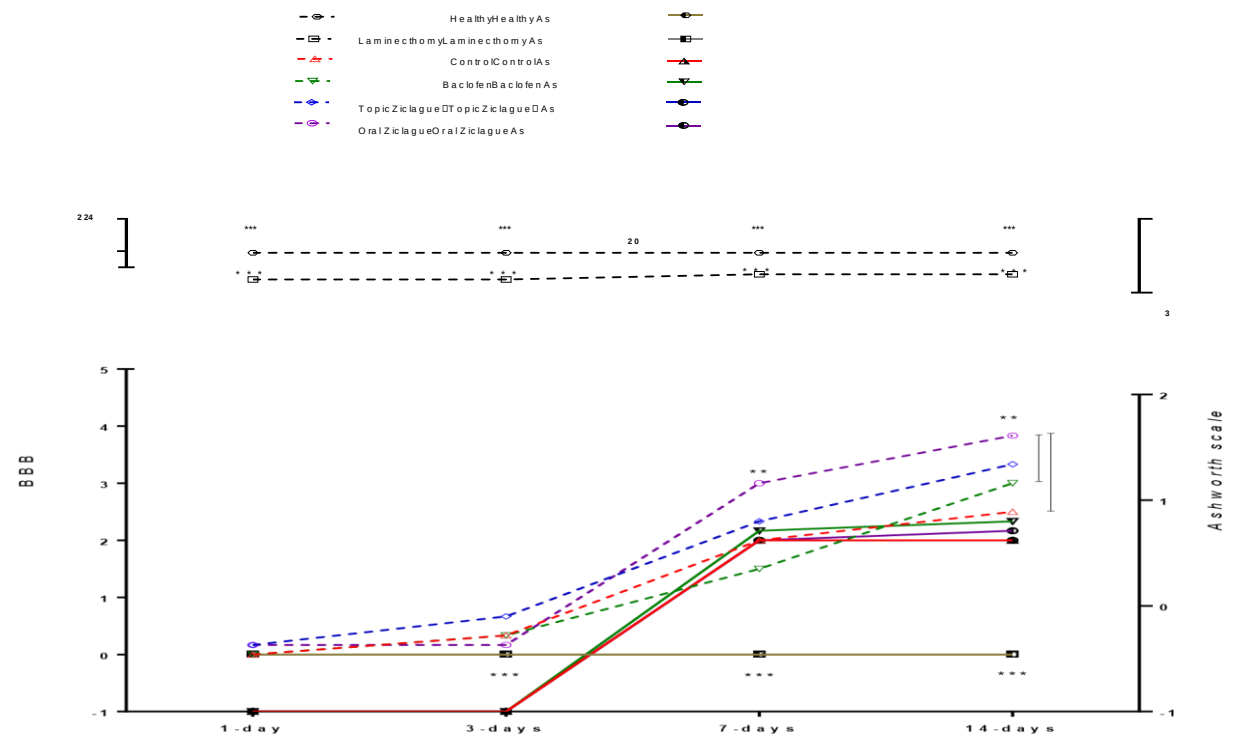


Fig. 2

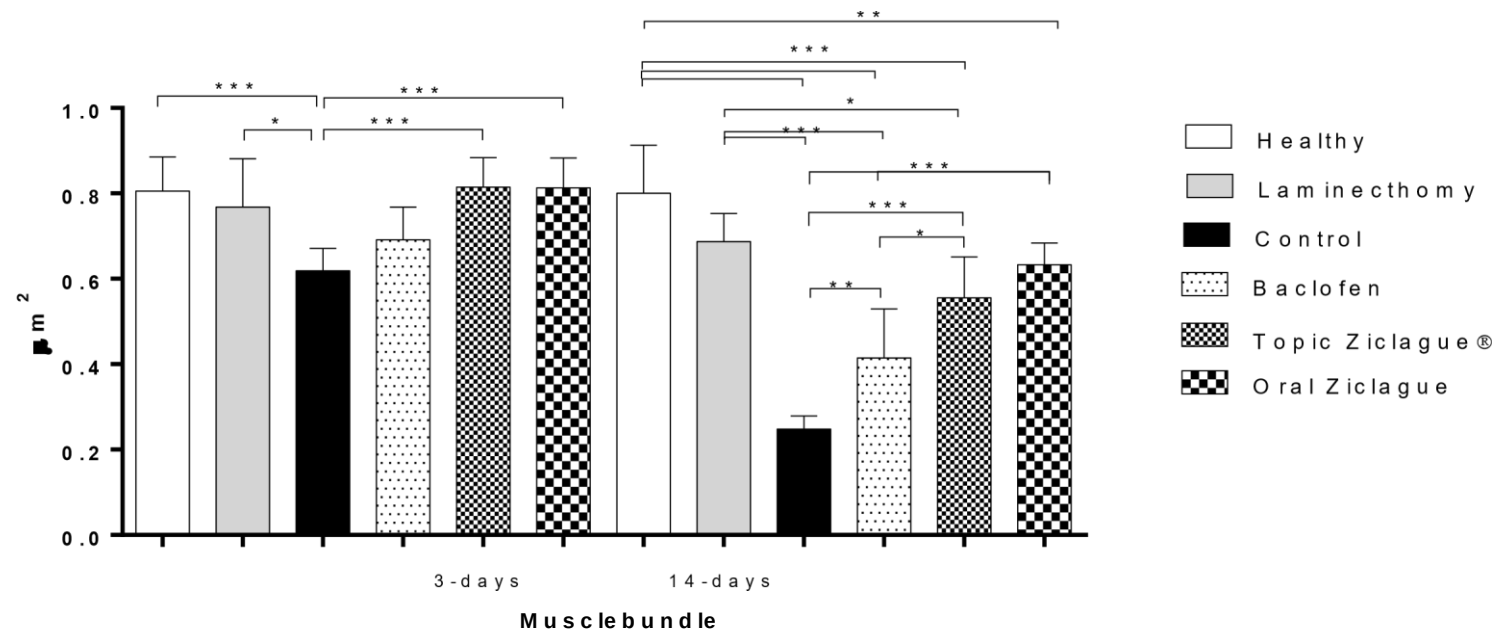


Fig. 3

SADIO	A	LAMINECTOMIA	B	CONTROLE	C
-------	---	--------------	---	----------	---

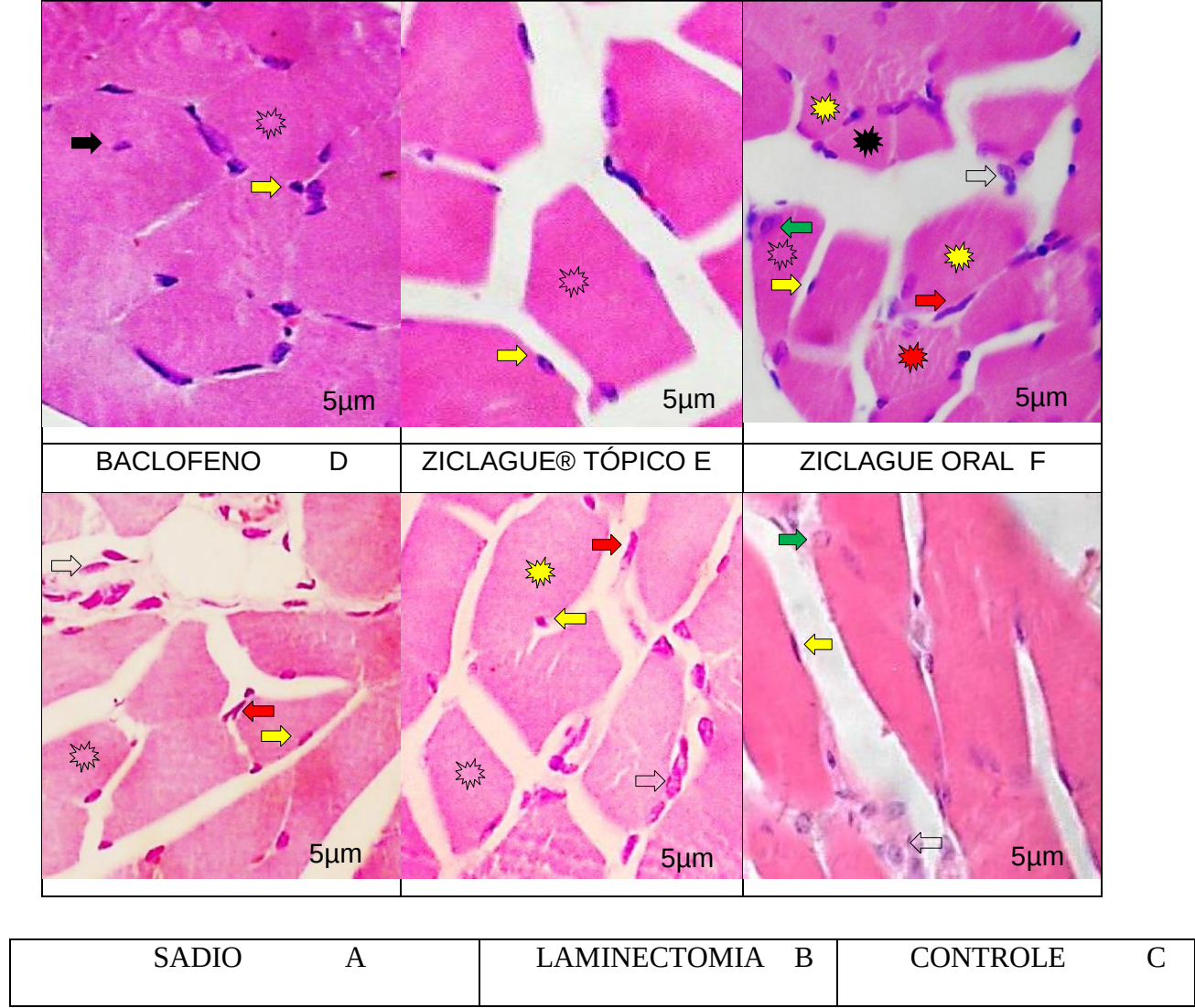


Fig. 4

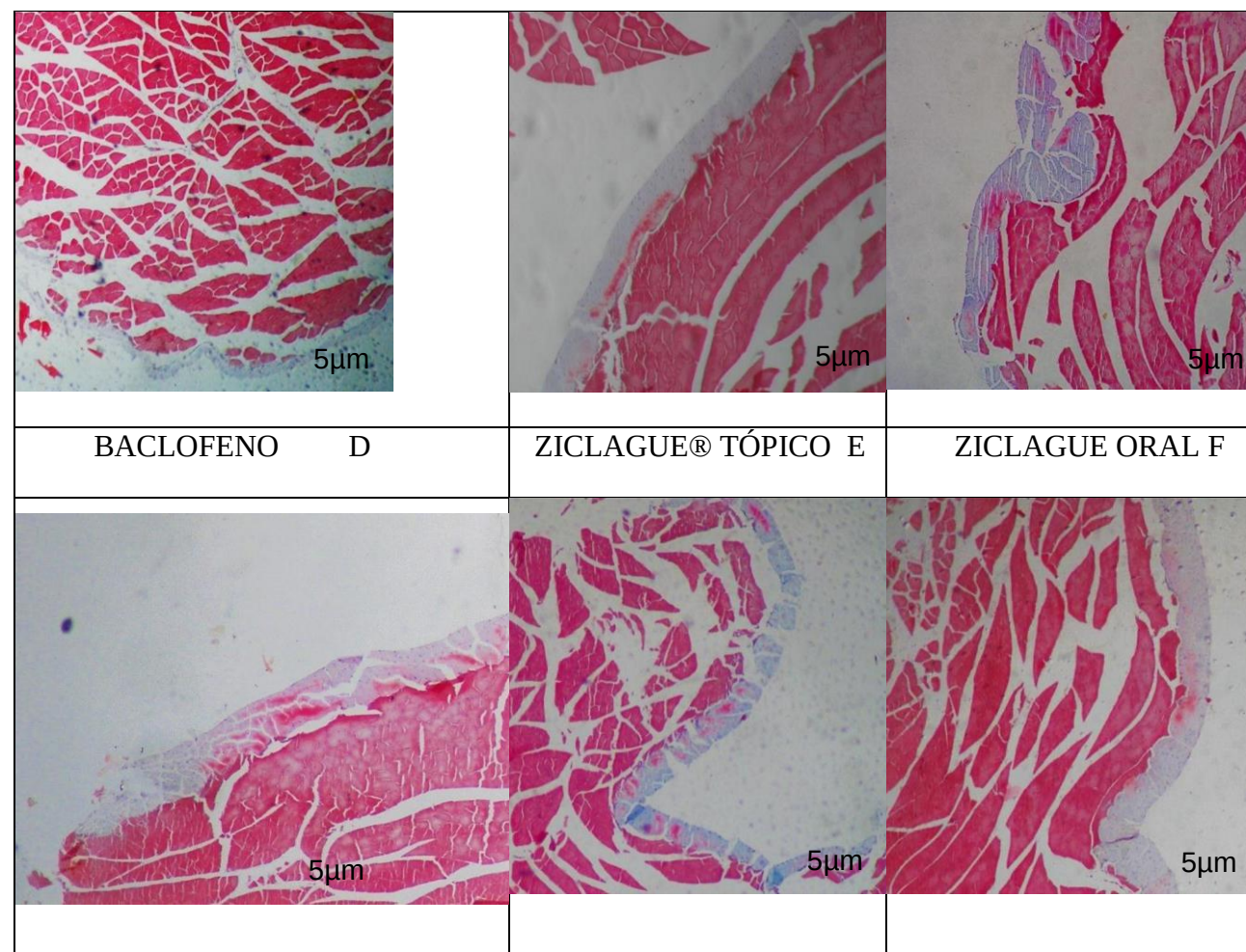


Fig. 5

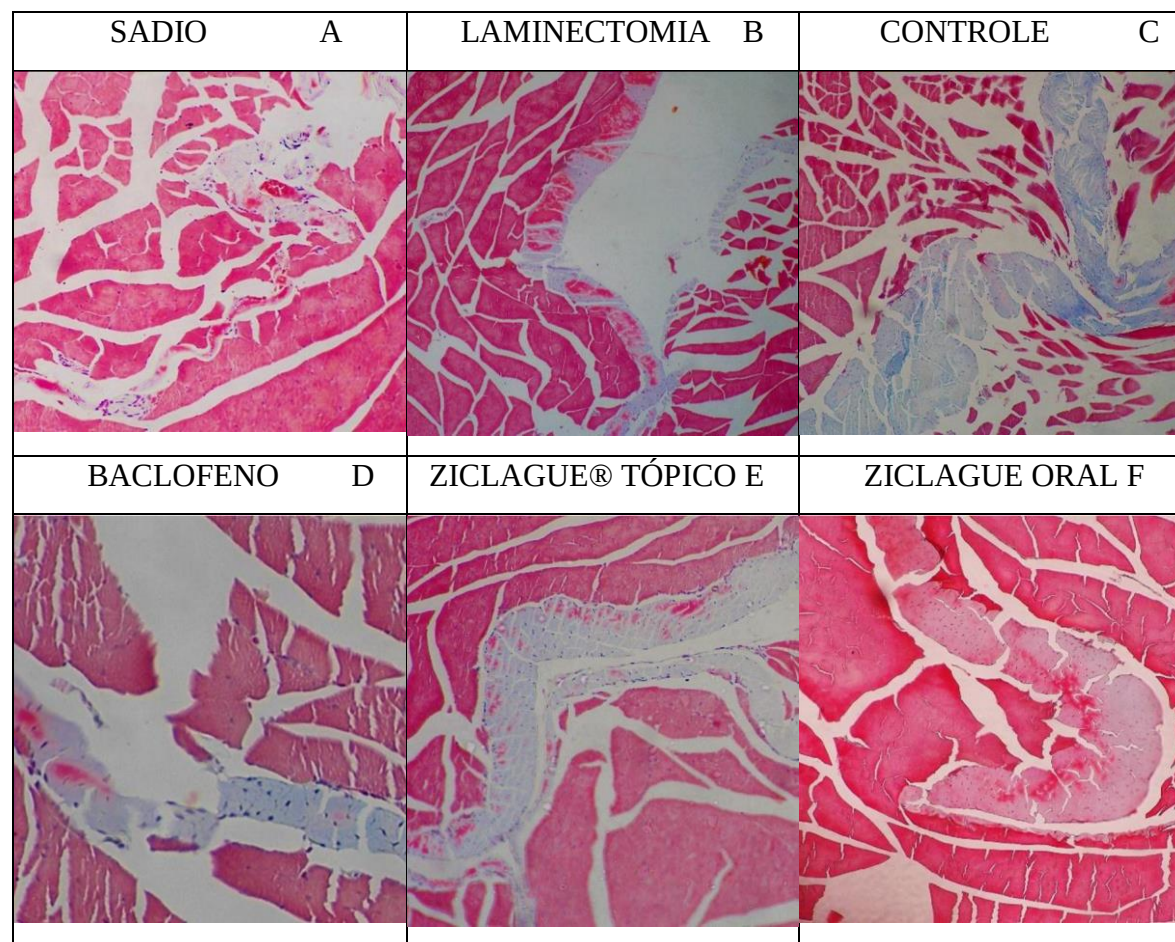


Fig. 6

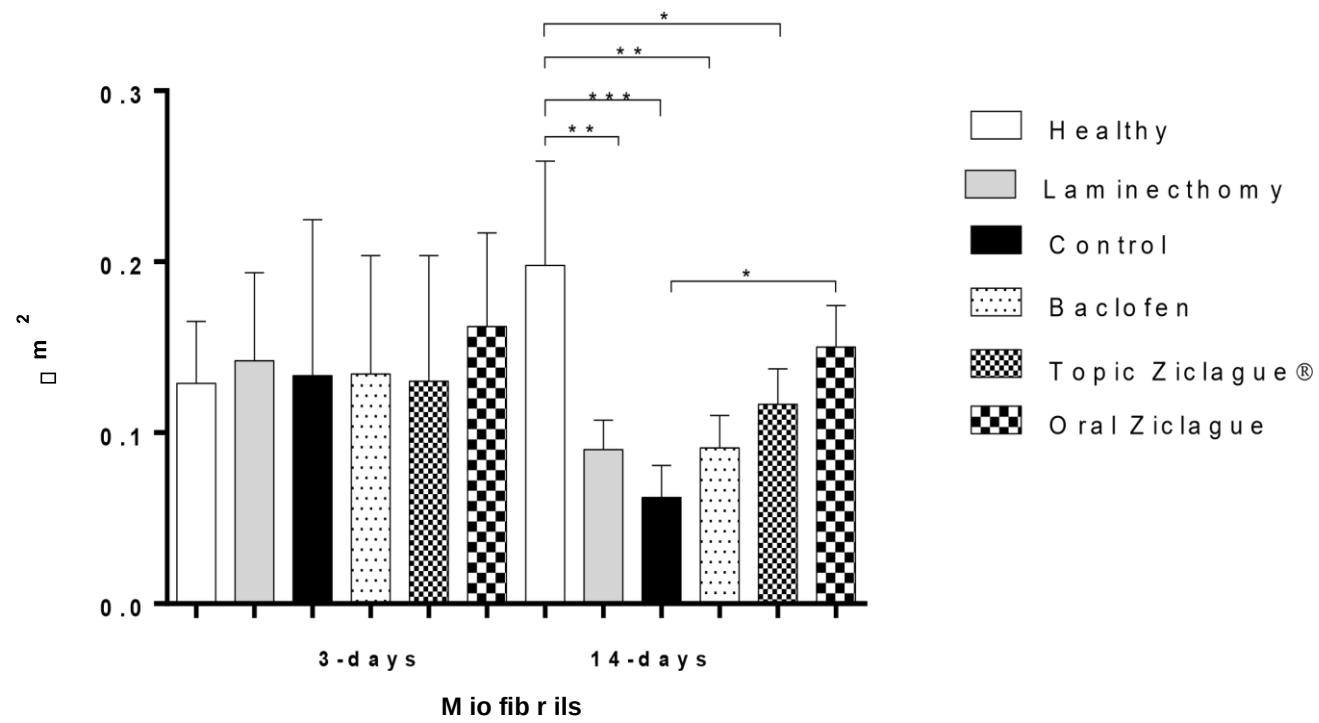


Fig. 7

Healthy
B

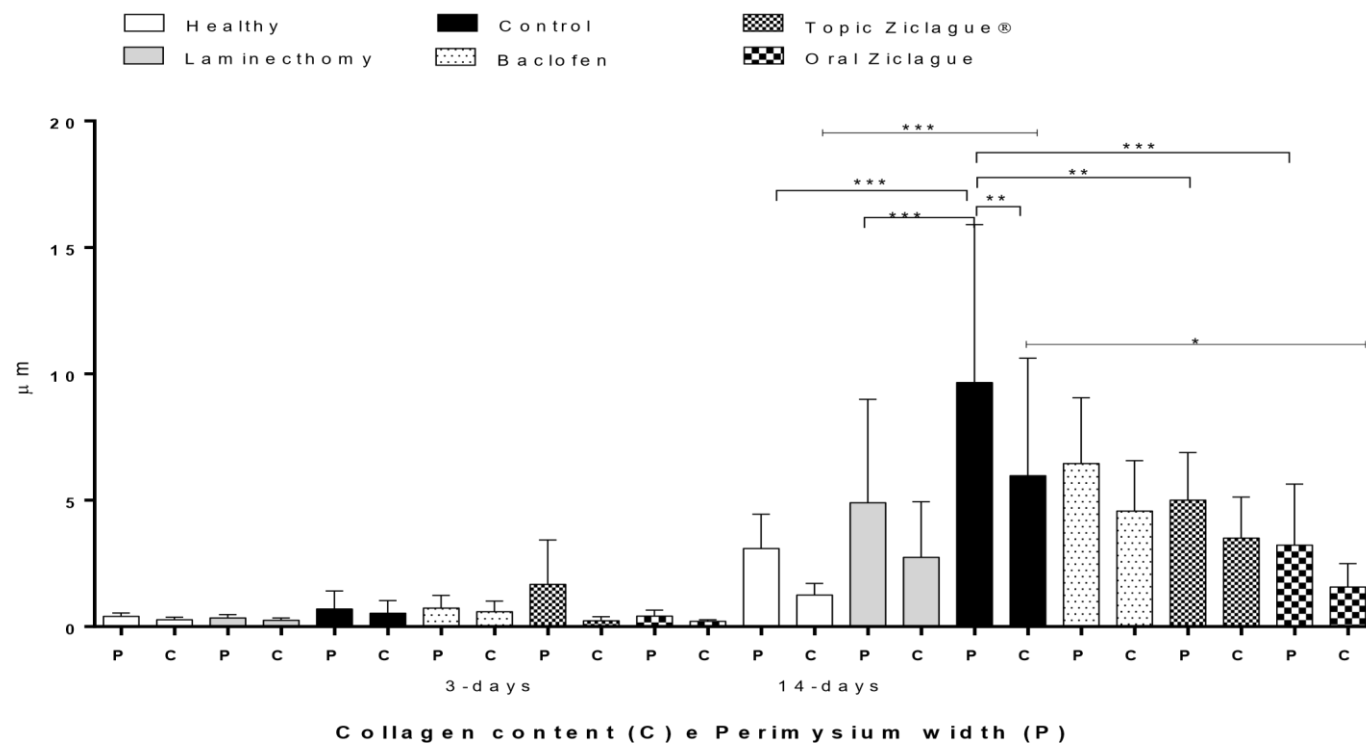


Tabela 1

14 days of treatment	Epimisium		Perimisium	
	Type I	Type III	Type I	Type III
Collagen				
Healthy	55,55%	44,44%	16,66%	83,33%
Laminectomy	84,61%	15,38%	28,57%	71,42%
Control	50%	50%	60%	40%
Baclofen	50%	50%	66,66%	33,33%
Topic Ziclague®	31,25%	68,75%	35%	65%
Oral Ziclague	44,44%	55,55%	23,07%	76,93%

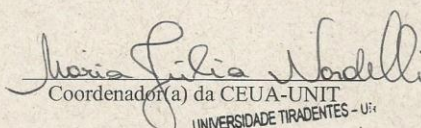
CONCLUSÃO

Com este estudo, os grupos Ziclague® Tópico e Ziclague Oral mostraram eficácia na aceleração da recuperação funcional motora após lesão medular em ratos. Foi verificado também que o grupo Ziclague Oral apresentou-se melhor em relação aos demais grupos experimentais e ao grupo Controle, por vezes, assemelhando-se ao grupo Sadio em relação às variáveis larguras e preenchimento de colágeno em endomisio e perímio. Assim, evidenciou-se que o tratamento aplicado imediatamente após a lesão medular traz efeitos benéficos na sequela da espasticidade, favorecendo menor rigidez e maior flexibilidade ao tecido muscular. Entretanto, faz-se necessário o prolongamento do tratamento até a fase crônica de modo minimizar a hipertonia, elucidando melhor as ações do Ziclague®.

ANEXO I: Aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA)

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto, “Características de músculos espásticos em modelo experimental de traumatismo raquimedular em tratamento subagudo e crônico com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, Zingiberaceae”, processo nº 060514, 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 22 de maio de 2014.


Coordenador(a) da CEUA-UNIT
UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT

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

ANEXO II: Registro do medicamento Ziclague®



DICLOFENACO SÓDICO
SODEN 25351.143310/2008-24 02/2019
1.0583.0622.006-4 24 Meses
1 MG/ML SOL. OIT. CT. FR. PLAS. OPC. GOT. X 10 ML
1988 SIMILAR - CANCELAMENTO DE REGISTRO DA APRESENTAÇÃO DO MEDICAMENTO
1.0583.0622.007-2 24 Meses
1 MG/ML SOL. OIT. CT. FR. PLAS. OPC. GOT. X 5 ML
1988 SIMILAR - CANCELAMENTO DE REGISTRO DA APRESENTAÇÃO DO MEDICAMENTO
1.0583.0622.008-0 24 Meses
1 MG/ML SOL. OIT. CT. FR. PLAS. OPC. GOT. X 2,5 ML
1988 SIMILAR - CANCELAMENTO DE REGISTRO DA APRESENTAÇÃO DO MEDICAMENTO
GLAXOSMITHKLINE BRASIL LTDA
vacina contra sarampo + vacina contra caxumba + vacina contra rubéola
1.0107.0145.001-1 24 Meses
PO LIOF. INJ. CT. FA. VD. INC. MONODOSE + AMP. VD. INC. DIL. X 0,5 ML
1515 PRODUTO BIOLÓGICO - ALTERAÇÃO DE ACONDICIONAMENTO PRIMÁRIO
1.0107.0145.002-8 24 Meses

1799 FITOTERÁPICO - INCLUSÃO DE NOVO ACONDICIONAMENTO
VITIS VINIFERA L.
VITIS 25351.062131/2003-82 07/2014
1.1860.0062.001-6 24 Meses
142,10 MG CAP. GEL. MOLE CT. BL. AL. X 15
1811 FITOTERÁPICO - CANCELAMENTO DE REGISTRO DO MEDICAMENTO A PEDIDO
1.1860.0062.002-4 24 Meses
142,10 MG CAP. GEL. MOLE CT. BL. AL. X 30
1811 FITOTERÁPICO - CANCELAMENTO DE REGISTRO DO MEDICAMENTO A PEDIDO
PASSIFLORA INCARNATA
MARACUJÁ HERBARIUM 25351.180343/2002-60 09/2017
1.1860.0075.002-3 24 Meses
320 MG COM. REV. CT. BL. AL. PLAST. INC. X 30
1810 FITOTERÁPICO - CANCELAMENTO DE REGISTRO DA APRESENTAÇÃO DO MEDICAMENTO A PEDIDO
1.1860.0075.003-6 24 Meses
320 MG COM. REV. CT. BL. AL. PLAST. INC. X 45
1810 FITOTERÁPICO - CANCELAMENTO DE REGISTRO DA APRESENTAÇÃO DO MEDICAMENTO A PEDIDO
1.1860.0075.004-7 24 Meses
320 MG COM. REV. CT. BL. AL. PLAST. INC. X 60

DO MEDICAMENTO
1.3531.0033.009-1 24 Meses
0,08 ML/ML SOL. OR. FR. PLAS. AMP. X 150 ML
1790 FITOTERÁPICO - ALTERAÇÃO DE NOME COMERCIAL DO MEDICAMENTO
INDUSTRIA FARMACÊUTICA MILIAN LTDA
EXTRATO DE VALERIANA OFFICINALIS
VALERIMIL 25351.112829/2005-18 08/2015
1.0624.0235.001-1 24 Meses
50 MG COM. REV. CT. BL. AL. PLAS. INC. X 30
1743 FITOTERÁPICO - CANCELAMENTO DE REGISTRO DO MEDICAMENTO POR TRANSFERÊNCIA DE TITULARIDADE
INFAN INDUSTRIA QUIMICA FARMACEUTICA NACIONAL S/A
ALPINIA ZERUMBET (PERS.) B.L. BURTT ET R.M.SMITH
ZICLAGUE 25351.207153/2012-85 05/2019
1.1557.0069.001-7 24 Meses
0,08 ML/ML CT. FR. AL. 30 ML
1697 FITOTERÁPICO - REGISTRO DE MEDICAMENTO
1.1557.0069.002-5 24 Meses
0,08 ML/ML CT. FR. AL. 60 ML
1697 FITOTERÁPICO - REGISTRO DE MEDICAMENTO
JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA
etravirina



Ver arquivo da Pág. 7 em PDF

Pág. 7. Suplemento - Seção 1. Diário Oficial da União (DOU) de 05 de Maio de 2014



1743 FITOTERÁPICO - CANCELAMENTO DE REGISTRO DO MEDICAMENTO POR TRANSFERÊNCIA DE TITULARIDADE INFAN INDUSTRIA QUIMICA FARMACEUTICA NACIONAL S/A

ALPINIA ZERUMBET (PERS.) B.L. BURTT ET R.M.SMITH

ZICLAGUE 25351.207153/2012-85 05/2019

1.1557.0069.001-7 24 Meses

0,08 ML/ML CT. FR. AL. 30 ML

1697 FITOTERÁPICO - REGISTRO DE MEDICAMENTO

1.1557.0069.002-5 24 Meses

0,08 ML/ML CT. FR. AL. 60 ML

1697 FITOTERÁPICO - REGISTRO DE MEDICAMENTO

JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA

etravirina

ANEXO III: Escala Basso, Beattie e Bresnahan

Quadro 1. Pontuação do protocolo BBB.		
Pontuação	Características	Comentário
0	Não se observam movimentos de membro posteriores (MP)	
1	Movimentos suaves de 1 ou 2 articulações de membro posterior	Suave – Menor que 50% da capacidade articular
2	Movimento extenso de 1 articulação e possível movimento suave de outra articulação no membro posterior	Extenso – Maior ou igual a 50% capacidade articular
3	Movimento Extenso de 2 articulações do MP	Duas articulações = quadril e joelho, geralmente
4	Movimentos suaves de todas as 3 articulações	Três articulações = quadril, joelho e tornozelo
5	Movimentos suaves de 2 articulações, extenso da 3ª articulação do MP	
6	Movimentos extensos de 2 articulações e movimento delicado da 3ª articulação do MP	3ª articulação = tornozelo
7	Movimentos extensos das 3 articulações	
8	Movimentos suaves, sem suportar o peso do corpo ou a pata apoiada sem suportar o peso do corpo	Extensão rítmica de 3 articulações do membro posterior, o tronco se encontra de lado
9	Apoio plantar com suporte do peso do corpo imóvel ou ocasional, frequente ou consistente suporte do peso do corpo com apoio dorsal	Suporte do peso = contração do músculo. Extensão do membro posterior durante o apoio plantar da pata ou elevação da bacia imóvel
10	Passo sustentando o peso do corpo ocasionalmente, sem haver coordenação entre os membros anterior e posterior	Ocasionalmente > 5ª e menor ou igual que 50%. Passos – contato plantar com suporte do peso, o membro posterior avança para restabelecer contato plantar. Coordenação – movimentos simultâneos entre o membro posterior e o membro anterior, alternando entre os lados.
11	De frequente a consistentes passadas com suporte do peso sem coordenação entre os membros posteriores e anteriores	Frequência – 51 a 94% do tempo Consistente – 95 a 100% do tempo
12	De frequentes a consistentes passadas com suporte do peso do corpo e coordenação ocasional entre o os membros anteriores e membros posteriores	60 a 50% de locomoção coordenada
13	De frequente a consistentes passadas com suporte do peso e frequente coordenação entre o membro posterior e o membro anterior	51 a 95% de locomoção coordenada
14	Consiste coordenação da passada com apoio plantar e posição predominante da pata e de rotação no contato inicial e na elevação, frequente passadas plantares, consistente coordenação entre o membro anterior e ocasionalmente com apoio dorsal	Rotação => rotação interna e externa da pata traseira quando esta apoiada e erguida
16	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, predominante posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação	Frequente liberdade do 1º dedo => Há mais da metade das passadas sem ouvir os sons das arranhaduras
17	Consiste coordenação da passada com apoio plantar, predominante posição em paralelo da pata no contato inicial e na sua elevação	
18	Coordenação consistente na passada com apoio plantar e consistente liberação do 1º dedo. Posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação	Consiste arranhadura de quatro dedos por um período de 4 minutos
19	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, consistente liberação do 1º dedo. Posição paralela da pata no contato inicial e na elevação e o rabo está para baixo na maior parte do tempo	Rabo para baixo => rabo toca o chão durante as passadas
20	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, consistente liberação do 1º dedo. Posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação, o rabo consistentemente para cima e instabilidade de tronco.	Rabo elevado => não toca o chão. Instabilidade do tronco => lateralização do tronco quando se vira rapidamente (perda de equilíbrio)
21	Consistentemente coordenada na caminhada, consistente movimento do 1º dedo. Posição da pata paralela no apoio e na elevação. O rabo para cima Estabilidade consistente do tronco	Consistente estabilidade do tronco, sem cambalear ou cair, o movimento da bacia e do rabo coordenado com a locomoção

Quadro 1 - Escala de Ashworth modificada

Grau	Observação clínica
0	Tônus normal.
1	Aumento do tônus no início ou no final do arco de movimento.
1+	Aumento do tônus em menos da metade do arco de movimento, manifestado por tensão abrupta e seguido por resistência mínima.
2	Aumento do tônus em mais da metade do arco de movimento.
3	Partes em flexão ou extensão e movidos com dificuldade.
4	Partes rígidas em flexão ou extensão.

Fonte: Dados da pesquisa.