

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM NANOEMULSÃO A BASE DO ÓLEO
ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* ASSOCIADO AO TREINO EM ESTEIRA
APÓS LESÃO MEDULAR EM MODELO EXPERIMENTAL**

CARLOS HENRIQUE DA SILVA MARCELINO

ARACAJU – SE

2021

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM NANOEMULSÃO A BASE DO ÓLEO
ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* ASSOCIADO AO TREINO EM ESTEIRA
APÓS LESÃO MEDULAR EM MODELO EXPERIMENTAL**

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

CARLOS HENRIQUE DA SILVA MARCELINO

Orientador (es):

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

ARACAJU - SE
2021

Marcelino, Carlos Henrique da Silva

M314e Efeitos do tratamento com nanoemulsão a base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* associado ao treino em esteira após lesão medular em modelo experimental / Carlos Henrique da Silva Marcelino ; orientação [de] Prof.^a Dr.^a Edna Aragão Farias Cândido - Aracaju: UNIT, 2021.

52 f. il ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2021

1. *Alpinia* 2 Espasticidade muscular 3. Fitoterapia 4. Medula espinhal I.Marcelino, Carlos Henrique da Silva II. Cândido, Edna Aragão Farias (orient.). III. Universidade Tiradentes. I V. Título.

CDU:615.322.03

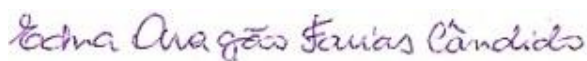
SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

EFEITOS DO TRATAMENTO COM NANOEMULSÃO A BASE DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* ASSOCIADO AO TREINO EM ESTEIRA APÓS LESÃO MEDULAR EM MODELO EXPERIMENTAL

CARLOS HENRIQUE DA SILVA MARCELINO

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:



Profª Dra. Edna Aragão Farias Cândido
Orientadora



Profª Dra. Patrícia Severino
1ª Avaliadora
Programa de pós-graduação Stricto sensu em
Biotecnologia Industrial – Universidade Tiradentes



Profª Dra. Margarete Zanardo Gomes
2ª Avaliadora
Programa de pós-graduação Stricto sensu em Saúde e
Ambiente - Universidade Tiradentes

Profº Dr. Maria Nogueira Marques
3º Avaliador (Suplente)

Programa de pós-graduação Stricto sensu em Saúde e
Ambiente - Universidade Tiradentes

ARACAJU-SE
2021

DEDICATÓRIA

Dedico este mestrado a Deus por ser meu alicerce
e aos meus Pais por serem minha força motriz.

“O Senhor é a minha força e o meu escudo, nele o meu coração confia e dele recebo ajuda”

Salmos 28:7

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me proporcionar força, sabedoria e muita persistência durante toda essa caminhada ao longo do mestrado me fazendo concluir com êxito todas as etapas que surgiram e alçar voos que não imaginei.

Aos meus Pais, por todo apoio incondicional, pelas palavras de força e incentivo que me fazem crescer e buscar sempre o melhor para nós. São os meus maiores exemplos, e louvo a Deus todos os dias por tê-los na minha vida. OBRIGADO POR TUDO!

Agradeço a mim mesmo, por nunca ter deixado de acreditar em mim, por ter trabalhado duro, por não ter tirado folga se abdicando de vários feriados e finais de semanas e por nunca ter cogitado em desistir.

À toda a minha família que por meio de palavras, conselhos e brincadeiras sempre me incentivaram a continuar e persistir até o final.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Edna Aragão, por todo o suporte desde o 6º período da minha graduação, durante a iniciação científica, TCC e agora no mestrado. Obrigado por todos os ensinamentos, conselhos, broncas e risadas, que contribuíram muito para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Às minhas segundas orientadoras, Prof^o. Dr^a Margaret Zanardo Gomes e Prof^o. Dr^a Sônia Oliveira Lima, por todo suporte e solicitude oferecido durante todo esse período.

À todo corpo docente do Programa de Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes, pela contribuição na minha formação acadêmica. E aos colegas e amigos de Turma, em especial: Cláudio, Cynthia, Lúcio, Robert.

As amigas de turma, que se tornaram amigas para vida Kathlen e Ana Clara, obrigado por todos os conselhos, incentivos e risadas que compartilhamos em todos os momentos ao longo desses dois anos de caminhada.

À Genesys e Drielly, que desde o final da graduação me incentivaram a continuar nesse mundo da pesquisa, obrigado por todo apoio, incentivos, pelas ajudas e resenhas durante essa jornada.

Á todos que compõem o LBPN e em especial aos que me ajudaram nessa caminhada: Luis, Vitor, Alessandra, Laira e Laiany que foi uma peça fundamental nos ensinamentos no manejo e cirurgias dos animais, obrigado pela paciência e parceria que fizemos durante esse período.

Aos amigos da Diretoria, dos descarados, do XII GENTE, Bruno Leonardo, por estarem sempre presentes mesmo que distantes fisicamente ao longo desse tempo.

A Universidade Tiradentes e a CAPES, pelo incentivo financeiro para realização deste estudo.

E a todos que contribuíram, de alguma forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e na minha caminhada, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 -	13
2 - OBJETIVOS	13
2.1 - Geral	14
2.2 - Específicos	14
3 - REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 - Traumatismo Raquimedular	14
3.2 – Fisiopatologia do traumatismo raquimedular	15
3.3 - Espasticidade	17
3.4 - TRATAMENTO PARA ESPASTICIDADE	18
3.4.1 - Tratamento Farmacológico:	18
3.4.2– Fitoterapia	18
3.4.3 - <i>Alpinia zerumbet</i>	19
3.4.4 – Nanoemulsão	21
3.4.5 – Fisioterapia	22
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 - Tipo do estudo	22
4.2 - Local da Pesquisa	22
4.3 - Aspectos Éticos	22
4.4 - Nanoemulsão	22
4.5 - Amostra e tratamento	23
4.6 - Procedimento Cirúrgico	23
4.7 - Protocolo de Tratamento	24
4.8 - Avaliação da espasticidade	24
4.9 - Avaliação Comportamental	24
4.10 - Preparação das amostras para estudos histológicos e Fixação	25
4.11 - Quantificação do trofismo muscular e neurônios	25
4.12 - Quantificação de colágeno	26
4.12 - Análise estatística	27
5 - RESULTADOS	27
6 – DISCUSSÃO	34
7 - Conclusão	38

8 – REFERÊNCIAS	39
ANEXOS/APÊNDICES.....	46
ANEXO 1	47
ANEXO 2	48
ANEXO 3	48

RESUMO

O traumatismo raquimedular é um dos mais severos acometimentos que afeta o ser humano. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com Nano*Alpinia* à base de óleo essencial de *Alpinia zerumbet* associado ao treinamento em esteira após lesão medular em modelo experimental. Trata-se de um estudo Pré-clínico, cego com abordagem analítica quantitativa, utilizando 18 ratos (Wistar) que foram submetidos ao processo de compressão medular, sendo divididos em 4 grupos: Sadio, Lesão-Esteira, Ziclague e Nano*Alpinia*25%. Após realizou-se 59 dias de exercícios em esteira seguidamente de 35 dias com tratamentos medicamentosos associados a exercícios em esteira, totalizando 110 dias. Foram realizados análises comportamentais, clínicas e avaliação histomorfológica dos músculos para verificar os níveis de colágeno e trofismo muscular, e a nível medular foi verificado o quantitativo de motoneurônios, astrócitos reativos e células gliais integras. Para análise estatística, foi aplicado o teste ANOVA ONE-WAY e TWO-WAY com pós teste de Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn em dados não paramétricos. Na Escala de *Ashworth*, houve redução significativa nos grupos tratados com Ziclague e Nano*Alpinia* apresentando médias de $1,12 \pm 0,12$ e $1,3 \pm 0,15$ respectivamente ($p < 0,01$). Na avaliação funcional, o grupo Ziclague e Nano*alpinia* apresentaram maiores níveis funcionais com média de $20 \pm 4,05$, $18,00 \pm 1,54$ respectivamente, em comparação com o Lesão-Esteira, na análise entre grupos ($p < 0,05$). Referente as análises histológicas, ocorreu redução significativa nos níveis de colágeno nos grupos Nano*Alpinia* e Ziclague® em comparação com Lesão-Esteira, refletindo na melhoria do nível funcional ($p < 0,05$). Com relação a largura desse colágeno no endomísio e perimísio, ocorreu redução significativa nos grupos Nano*Alpinia* e Ziclague®, mostrando uma menor largura dessas fibras de colágenos, em comparação ao grupo Lesão-Esteira ($p < 0,001$), mostrando assim um menor índice de hipotrofia muscular. Na região da medula espinhal, houve diferenças significativas somente entre o grupo Sadio e Lesão-Esteira ($p < 0,05$). Nos astrócitos ocorreram diferenças significativas entre o grupo Sadio e Lesão-Esteira ($p < 0,001$). Nas células gliais vivas, não ocorreram diferenças significativas. Com relação a densidade integrada dos motoneurônios, o grupo Ziclague, Nano*Alpinia* e sadio apresentaram diferenças significativa em comparação com o Lesão-Esteira ($p < 0,05$) ($p < 0,001$). E o perímetro dos axônios todos apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Assim, a Nano*Alpinia* se mostra como uma possibilidade terapêutica, devido a sua performance similar ao Ziclague®, mesmo utilizando uma concentração menor do OEAz em sua formulação, e conseguindo obter redução da espasticidade muscular, fibras de colágenos organizadas, maior nível de motoneurônios, astrócitos e células gliais proporcionando maior progresso funcional.

Palavras chaves: *Alpinia*; Espasticidade muscular; Fitoterapia; Medula espinhal

ABSTRACT

Spinal trauma is one of the most severe conditions that affects humans. The aim of this study was to evaluate the effect of treatment with NanoAlpinia based on Alpinia zerumbet essential oil associated with treadmill training after spinal cord injury in an experimental model. This is a preclinical, blind study with a quantitative analytical approach, using 18 rats (Wistar) that were submitted to the spinal compression process, being divided into 4 groups: Healthy, Injury-Mat, Ziclague and NanoAlpinia25%. After 59 days of exercise on a treadmill followed by 35 days with drug treatments associated with exercises on a treadmill, totaling 110 days. Behavioral, clinical and histomorphological analysis of the muscles were performed to check the levels of collagen and muscle trophism, and at the medullary level, the number of motoneurons, reactive astrocytes and whole glial cells was verified. For statistical analysis, the ANOVA ONE-WAY and TWO-WAY test with Tukey's post-test for parametric data and Kruskal-Wallis with Dunn's post-test in non-parametric data were applied. On the Ashworth Scale, there was a significant reduction in the groups treated with Ziclague and NanoAlpinia, with averages of 1.12 ± 0.12 and 1.3 ± 0.15 respectively ($p < 0.01$). In the functional evaluation, the Ziclague and Nanoalpinia group showed higher functional levels with an average of 20 ± 4.05 , 18.00 ± 1.54 respectively, compared to the Track-Injury, in the analysis between groups ($p < 0.05$). Regarding histological analysis, there was a significant reduction in collagen levels in the NanoAlpinia and Ziclague® groups compared to Injury-Mat, reflecting the improvement in functional level ($p < 0.05$). Regarding the width of this collagen in the endomysium and perimysium, there was a significant reduction in the NanoAlpinia and Ziclague® groups, showing a smaller width of these collagen fibers, compared to the Lesão-Esteira group ($p < 0.001$), thus showing a lower rate of hypotrophy muscle. In the spinal cord region, there were significant differences only between the Healthy group and the Track-Injury group ($p < 0.05$). There were significant differences in astrocytes between the Healthy group and the Track-Injury group ($p < 0.001$). In living glial cells, there were no significant differences. Regarding the integrated density of the motoneurons, the Ziclague, NanoAlpinia and healthy group showed significant differences in comparison with the Track-Injury ($p < 0.05$) ($p < 0.001$). And the perimeter of the axons all showed significant differences between them ($p < 0.05$). Thus, NanoAlpinia shows itself as a therapeutic possibility, due to its performance similar to Ziclague®, even using a lower concentration of OEAz in its formulation, and achieving a reduction in muscle spasticity, organized collagen fibers, a higher level of motoneurons, astrocytes and glial cells providing greater functional progress.

Keywords: *Alpinia*; Muscle spasticity; Phytotherapy; Spinal cord

1 - INTRODUÇÃO

A lesão medular é considerada um dos mais severos acometimentos que pode afetar o ser humano com repercussão em todos os âmbitos, desde o social, emocional, funcional em consequência de fatores extrínsecos ou intrínsecos que lesionam a medula espinhal ocasionando alterações nas funções sensório-motoras, a depender da localização e de sua extensão afetando milhares de pessoas no mundo (MEHRHOLZ et al., 2017; ECKERT et al., 2018).

Após a lesão medular e a interrupção das vias nervosas, as musculaturas sofrem alterações na sua capacidade de contração e alongamento para a realização de movimentos. (AWAAD; RIZK, 2012). Como complicação secundária, apresenta espasticidade caracterizada por exacerbação dos reflexos miotáticos (EVANS et al., 2017). Tanto a contração quanto as fibras musculares são alteradas como resultado da modificação sofrida nos canais de cálcio do tipo L (D'AMICO et al., 2013)

O SNC lesionado, sofre uma mudança na atividade dos canais de cálcio do tipo L, permitindo contínuas correntes de Ca^{2+} para o sarcoplasma por ausência da modulação da serotonina gerando hiperatividade dos seus receptores, essa alteração gera hiperatividade de seus receptores correlacionada com alterações nos receptores dessa serotonina (MIAZGA et al., 2018). Além da elevação da tensão passiva e do reforço das ligações cruzadas entre a actina e a miosina dos músculos estriados, sendo necessário realizar a modulação dos canais de cálcio do tipo L, para que ocorra redução no grau de espasticidade, através de vias terapêuticas que otimizem a modulação tônica (CHENG; LIDERER, 2008).

Dentro do processo de reabilitação são utilizados diversos tipos de técnicas, exercícios, terapias medicamentosas de forma individual ou combinadas, para evitar complicações e potencializar a função dos indivíduos acometidos pela lesão medular. Uma das opções mais utilizadas é o treinamento de marcha no solo ou esteira, que se apresenta como preferência para reduzir os danos medulares, devido aos seus efeitos neuroprotetores que proporcionam uma redução de apoptose neuronal, e a utilização de agentes medicamentosos de forma combinada com o exercício, acabam potencializando e contribuindo para maior eficácia na recuperação motora (CHOI; LEE, 2017).

O fitomedicamento a base do óleo essencial Ziclague® já vem atuando na modulação dos canais de cálcio mostrando-se capaz de influenciar e reverter alterações morfológicas ocasionadas mediante a ação da espasticidade, contribuindo e influenciando diretamente no ganho e maximização da funcionalidade (Maia et al, 2016; Cândido et al., 2017; Oliveira et al., 2018 Cerqueira et al., 2015). Entretanto existe contraindicação

relacionada a possível indução na redução da pressão arterial (100/60 mmHg) (CÂNDIDO; XAVIER-FILHO, 2012).

Diante disso, a nanotecnologia, por meio de sua vertente chamada nanoemulsão, que consiste em uma solução composta por uma fase oleosa e outra aquosa, com partículas de tamanho nanométrico se apresentam com potencial de maximizar a utilização das propriedades terapêuticas mediante suas vantagens em comparação com solução oleosa, gerando melhor penetração em contato com a pele e uma liberação dos efeitos possivelmente de forma mais controlada (IKUMAPAYI, 2020).

Nesse sentido a *NanoAlpinia*, derivado do OEAz, apresenta-se com possível capacidade em potencial para contornar os efeitos hipotensores em pacientes espásticos leves e com menor peso corporal visando a maximização no tratamento dos músculos espásticos e maior performance funcional dos indivíduos tratados mediante suas características supracitadas.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Geral

Avaliar o efeito do tratamento com *NanoAlpinia* à base de óleo essencial de *Alpinia zerumbet* associado ao treino em esteira após lesão medular em modelo experimental.

2.2 - Específicos

- Avaliar e quantificar as características histomorfológicas da medula espinal;
- Avaliar características histomorfológicas das fibras musculares, como miofibrila, endomísio e perimísio;
- Mensurar o grau de espasticidade muscular através da *Escala de Ashworth Modificada*
- Mensurar capacidade locomotora dos ratos pós-lesão medular.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Traumatismo Raquimedular

O traumatismo raquimedular que também pode ser chamado de lesão medular acomete a medula espinhal, raízes nervosas ou qualquer um dos seus segmentos, decorrente de fatores extrínsecos a coluna vertebral, que vão desde uma simples queda até um acidente mais grave, seja automobilístico ou por violência urbana (RIEMANN et al., 2018).

O TRM possui uma maior prevalência em Homens com idade entre 15 a 34 anos, podendo ser explicada pelos seguintes fatores, como uma maior prevalência da imprudência

no trânsito, lesões esportivas e quedas. As áreas de maiores acometimentos são a região cervical e a região de transição toracolombar sendo os segmentos mais atingidos tanto em países desenvolvidos, como nos emergentes e que muitas vezes levam a morte ou deficiência motora (KANG et al., 2018).

A medula espinhal é a principal via das informações sensitivas e motoras, entre o corpo e o cérebro. Na coluna cervical, existem 8 raízes nervosas que vai da C1 a C7. Já a região torácica possui 12 raízes nervosas que vão de T1 a T12, a região lombar apresenta 5 raízes nervosas que saem do forame sacral. A cauda equina é um conjunto de pares de raízes nervosas lombossacrais que se originam no cone medular (DIMITRIJEVIC et al., 2015).

Em casos traumáticos, geralmente ocorre o chamado choque medular definida como um período de arreflexia total da medula espinhal. Durante essa fase que pode vir a acontecer logo de imediato, o paciente apresenta uma ausência total de sensibilidade, do reflexo bulbo cavernoso e dos movimentos voluntários, mesmo que a lesão não seja permanente e completa. A volta dos reflexos aponta o fim do choque medular, e assim permite a determinação do grau e do nível da lesão (SIDDALL, 2015).

O comprometimento da lesão dependerá do nível atingido, ou seja, quanto mais alta for a lesão, maior a perda, e quando a injúria acontecer em um nível mais baixo, maior preservação de movimentação e de sensibilidade. Ela também pode ser classificada em Tetraplegia que compromete função dos membros superiores e inferiores, tronco e órgãos pélvicos. O segundo é a paraplegia perde-se função dos membros inferiores e os superiores são mantidos. E por último pode-se classificar as lesões incompletas ou parciais, com tetraparesia ou paraparesia que é a perda parcial das funções motoras (KIRSHBLUM et al., 2011).

Existem uma gama de complicações associadas ao TRM, além do choque medular, pode acontecer choque neurogênico caracterizado por uma alteração nos tônus dos vasos sanguíneos dificultando a circulação sanguínea, também trombose venosa profunda, disreflexia autonômica, bexiga neurogênica, intestino neurogênico e espasticidade (ROUANET, 2017).

3.2 – Fisiopatologia do traumatismo raquimedular

A lesão medular (LM) é um dano fisiológico que afeta a medula espinal na qual pode ser de origem traumática ou não traumática. Dentro da fisiopatologia da LM identifica-se duas fases, a fase primária e a fase secundária (KIM et al., 2017). A primeira fase corresponde a injúria estrutural imediata a região da medula espinal e a segunda fase é

representada por lesões secundárias à lesão inicial (HACHEM et al., 2017; SHAO et al., 2019).

A fase primária ou lesão primária, refere-se a um trauma mecânico imediato. Essa lesão primária pode ser proveniente de lesões penetrantes, como um ferimento à bala, ou de lesões contusas, como um esmagamento ou quedas. Como consequência dessas agressões fisiológicas ocorrerão as lesões secundárias (NEZHAD et al., 2021).

A fase secundária, também identificada como a fase de lesões secundárias, ocorre posteriormente à fase primária e é caracterizada por uma cascata de eventos fisiológicos. Nesta fase há alguns distúrbios hemodinâmicos, como o edema e a hemorragia que comprometem a estrutura (AHUJA; FEHLINGS, 2016; HACHEM et al., 2017; SHAO et al., 2019). Ademais, acontecem a infiltração das células de defesa do corpo para o local da lesão. Esta fase contém três momentos denominados de fase aguda, fase subaguda e fase crônica (WINCENTAK et al., 2021).

A fase aguda compreende-se nas primeiras 48 horas posteriores à lesão primária. Em consequência do estresse causado pela lesão inicial, ocorre uma reação inflamatória que resulta no influxo de macrófagos no local da lesão. Consequentemente, após o rompimento vascular, haverá hemorragia, isquemia medular e edema (ELY et al., 2021).

Em decorrência do excesso de alguns neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, há uma impulsão para que ocorra lesão excitotóxica em neurônios e células gliais adjacentes que, posteriormente, facilitam a morte celular. Outro fator que contribui para a morte celular é o elevado estresse oxidativo que resulta em altos níveis de espécies reativas de oxigênio e a introdução de ATP, DNA e K⁺ no local da lesão (HAJJIOUOI; FORTASSI; BOUJRAF, 2021)

A fase subaguda acontece no período de até duas semanas após a lesão. Essa fase é caracterizada pelo aumento reativo de astrócitos, o que resulta na formação da cicatriz glial que funciona como um obstáculo para a regeneração dos axônios. Ademais, a proliferação dos astrócitos bloqueia a construção de sinapses despadronizadas (MUMMANENI et al., 2020).

A fase crônica corresponde ao período de 6 meses posteriores à lesão (KIM et al., 2017; SHAO et al., 2019). Nessa fase identifica-se uma continuidade das ocorrências da fase subaguda, como por exemplo, a restrita regeneração axonal devido a cicatriz glial (REINHARDT et al., 2020).

3.3 - Espasticidade

A espasticidade é resultante de uma lesão neurológica na via piramidal, que se caracteriza pelo aumento do estado de tônus muscular mediante a movimentação passiva à medida que se modifica a velocidade do movimento, em consequência de lesão no motoneurônio superior. Conforme o tipo e o nível da lesão, a espasticidade é constantemente acompanhada por um conjunto de sinais clínicos, que incluem a existência de reflexos patológicos, clônus, alteração na deglutição, espasmos e disfunção do sistema nervoso autônomo. (WIETERS, et al 2020; MUKHERJEE; CHAKRAVARTY, 2010)

É estimado que atualmente uma média de 12 milhões de pessoas, estejam afetadas pela presença espasticidade, sendo considerada uma das causas mais comuns de deficiência física no mundo, e que impacta diretamente nas condições funcionais mediante a suas atividades de vida diária, socioeconômicas e na qualidade de vida. (SVENSSON et al., 2014; STEVENSON et al., 2015)

Em decorrência da lesão no SNC os impulsos motores descendentes que vão de encontro as unidades motoras apresentam uma redução do neurotransmissor acetilcolina responsável na despolarização dos músculos estriados e produção de contração. No estudo de Smith et al. (2009) observaram em crianças com paralisia cerebral uma expressão alterada nos genes dos canais de potássio, voltagem dependente de cálcio intracelular (KCNN3). Esta alteração se apresentou de forma elevada ocasionando hiperpolarização, comportamento típico dos músculos imaturos. Verificaram que os genes dos receptores rianodínicos, responsáveis por liberar os canais de cálcio no retículo sarcoplasmático para contração muscular não apresentaram alteração, assim como a regulação negativa dos genes FKBP1A e PDE4D que são responsáveis na regulação do extravasamento de cálcio.

No entanto, o excesso crônico de cálcio intracelular foi em consequência do crescimento da expressão do gene da regulação dos canais de Ca^{2+} tipo L (CACNB1 e CACNA1S), cálcio de baixa voltagem que aciona a titina. Este cálcio prece a estimulação dos receptores rianodínicos (SMITH et al., 2009). Desta forma no começo do processo de excitação-contração muscular o gene CACNA1S é encontrado com alteração conformacional em consequência da modificação de voltagem para excitação celular secundário ao “gating” (HERNANDEZ-OCHOA; SCHNEIDER, 2012).

Além disso, ocorrem modificações relacionadas a concentração de colágeno no musculo. No estudo de (Smith et al., 2011), foi encontrado em seu estudo executado por meio de biopsia muscular dos isquiotibiais de crianças com paralisia cerebral espástica, alterações na matriz extracelular e uma concentração no teor de colágeno contribuindo assim para evolução da rigidez passiva e contratura muscular.

No estudo de Cerqueira et al. (2015), observou-se que houve uma regressão nas mudanças relacionadas a espessura e organização de colágeno do tipo I nos músculos espásticos de ratos após lesão medular que foram tratados com fitomedicamento a base de óleo essencial da *Alpinia zerumbet* e Cinesioterapia combinados.

Outra alteração em decorrência da presença da espasticidade é a modificação que ocorre na cadeia pesada de miosina de fibras tipo IIx, gerando assim uma elevação na tensão passiva na musculatura espástica em decorrência das alterações sofridas na matriz extracelular e fibras musculares. Com isso, o estudo de Smith et al. (2009) encontraram alterações no fenótipo das fibras musculares lentas, tornando-se rápidas devido ao aumento da transcrição gênica vinculada ao fenótipo de fibras lentas, especificamente a calcineurina (gene PPP3CA) e Calmodulina (gene CALM1).

As alterações sofridas na geração de forças derivadas do Ca^{2+} levaram ausência da atividade metabólica com transcrição vinculadas as mitocôndrias, além do mais uma correlação inversa de maior rigidez muscular associada a um menor número de mitocôndrias (SCHIAFFINO et al., 2007; SMITH et al., 2012)

3.4 - TRATAMENTO PARA ESPASTICIDADE

3.4.1 - Tratamento Farmacológico:

O tratamento farmacológico ou medicamentoso é uma terapia baseada na utilização de medicamentos ou substâncias que influem na espasticidade. Dentre as opções mais utilizadas estão Baclofeno, Diazepam, Dantrolene, Clonidina, Tizanidina e Clorpromazina, além do tratamento local com o uso da toxina botulínica. O uso da toxina botulínica é feito de forma local, aplicando-se diretamente nos músculos espásticos, com o objetivo de melhorar a capacidade funcional, visto que atua na junção neuromuscular, obstruindo a liberação do neurotransmissor acetilcolina a nível pré-sináptico, gerando uma paralisia muscular. Estes medicamentos diminuem a excitabilidade dos reflexos espinhais, diminuindo de forma temporária a hipertonía, apesar de apresentar eficácia possuem efeitos adversos e limitados que acabam comprometendo o paciente (VÁSQUEZ, 2016). Além destes meios medicamentosos, outra vertente que está crescendo para o tratamento da espasticidade é a fitoterapia. (CHA; ARAMI, 2020)

3.4.2– Fitoterapia

É uma área medicinal que utiliza matéria prima de origem vegetal para elaboração de medicamentos fitoterápicos, que vem sendo utilizada a muitos anos pela medicina tradicional. Nos últimos cem anos ocorreu um grande avanço técnico-científico através de diversos estudos que possibilitou o conhecimento de muitas novas moléculas e seus

mecanismos de ação, confirmando a importância de tais moléculas e a capacidade sinérgica dos extratos com os demais componentes (COLALTO, 2017; FÜRST; ZÜNDORF, 2015).

Geralmente são utilizados toda a planta ou alguma parte específica para produção do fitoterápico, que pode ser utilizado por meio oral ou tópica, através do uso em pó, chás e óleo essencial. Por causa da sua absorção, os óleos essenciais derivados de matérias vegetais como flores, folhas, frutos e raízes, se apresentam como uma forma diferenciada dos medicamentos convencionais. Desta maneira, permite otimizar o produto no mercado devido à praticidade na aplicação (FALZON, 2017).

Os benefícios ao organismo do ser humano são variados e de acordo com a composição específica de cada óleo, os efeitos mais conhecidos são o anti-inflamatórios, antifúngicos, antibióticos, analgésicos e sedativos. Entre as plantas mais utilizadas para produção de fitoterápicos está o gengibre, camomila, calêndula e *Alpinia zerumbet* (SALLER, et al 2014; TESCHKE; XUAN, 2018).

3.4.3 - *Alpinia zerumbet*

O gênero *Alpinia* é um membro importante da família Zingiberaceae, e recebeu esse nome decorrente de uma homenagem ao botânico italiano Prospero Alpini. A *Alpinia zerumbet* é uma planta originária da Ásia e foi naturalizada nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, Oceania e Ásia, pertence à família Zingiberaceae, é encontrada na literatura científica como *Alpinia speciosa* K. Shum, *Costus zerumbet* Pers., *Languas speciosa* Small e *zerumbet speciosum* (LORENZI; SOUZA, 2001).

Trazida no século XIX para o Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde recebeu o nome de flor-de-redenção e bastão-do-imperador (CORRÊA, 1975), hoje é conhecida também popularmente como: tocha ou flor de cera; Colônia; Flor-da-redenção; Bastão-do-imperador; Paco-seroca; Cuité-açu; Pacova; Gengibre-concha; Bunga kantan; Gengibre; Kecombrang; Kincung; Vindica; Vindica-grande; Jardineira; Colônia espinho de cigano; Bunga kantan; Shell ginger (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Uma investigação crescente sobre os constituintes químicos e as bioatividades desse gênero tem sido realizada desde 1955. Consequentemente, as espécies de *Alpinia* demonstraram ter várias atividades biológicas, incluindo antiulcerativa, antiemética, antibacteriana, antitumoral, hipoglicêmica, cardioprotetora, antifungos, neuroproteção e atividades anti-ansiedade (MA et al., 2017).

Além destes efeitos, o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* se mostrou eficaz na modulação dos canais de Ca²⁺ tipo L, como visto no estudo de Santos et al. (2011), que verificou o efeito cardiopressor do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* em camundongos. Foi

possível constatar que o OEAz modula os canais de Ca^{2+} tipo L por meio de dose dependente e que os monoterpenos mais abundantes no OEAz são o terpineno-4-ol, 1,8 cineol, gama-terpinen e para-cimeno.

Cândido e Xavier-Filho (2012), avaliaram a viabilidade do uso do OEAz no tratamento da Paralisia cerebral por via dérmica e inalatória, com associação da cinesioterapia. Ao final do período de tratamento, foi encontrado um melhor resultado no tratamento associado da cinesioterapia com OEAz por via dérmica em comparação com o grupo tratado por meio inalatório, obtendo assim uma redução da espasticidade e tônus muscular, refletindo em melhor performance funcional.

Oliveira et al. (2018), analisaram a correlação entre funcionalidade e espasticidade em indivíduos espásticos tratados com fitoterápico a base de OEAz e cinesioterapia. Foi encontrado ao final do tempo total de tratamento que houve um aumento na capacidade funcional destes pacientes analisados por meio da Medida de independência Funcional (MIF) e uma redução da gravidade de acordo com a Classificação Internacional de Funcionalidade (CIF).

Em estudo de Cândido et al. (2017) que visou analisar a qualidade da contração muscular após o tratamento fisioterapêutico associado ao OEAz em paciente com síndrome piramidal por meio da escala de *ashworth* e eletromiografia. Ao finalizar o tratamento encontrou-se como resultado uma redução significativa da espasticidade refletindo diretamente na melhora da contração e recrutamento muscular elevando o nível de funcionalidade destes indivíduos.

Corroborando com o estudo anterior, Maia et al. (2016) realizou um estudo com o objetivo de analisar efeito do EOAz na contração muscular em pacientes espásticos pós-AVC. Estes pacientes foram submetidos à leitura eletromiografia de superfície do músculo gastrocnêmio, antes e após 10 aplicações diárias de OEAz no musculo gastrocnêmio e ao final do período da terapêutica foi constatado que houve ação relaxante e melhora no desempenho contrátil muscular em comparação com o gastrocnêmio sadio.

Cerqueira et al. (2015), verificaram a atuação do fitomedicamento a base de OEAz associado a Cinesioterapia sobre o colágeno dos tecidos musculares espásticos de ratos pós lesão medular. Foi observado a atuação do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) associada a Cinesioterapia em modelo murino pós lesão medular durante 30 dias, encontrando um resultado significativo no grupo tratado com OEAz associado a fisioterapia, se mostrando eficaz na reversão das alterações de espessura e organização do colágeno decorrentes da espasticidade, refletindo na melhora das características funcionais e histomorfológicas dos músculos espásticos.

Em estudo desenvolvido por Santos-Junior et al. (2017), que abordou a lesão parcial do tendão de Aquiles em modelo murino, foi observado que o tratamento com OEAz após 90 dias, promoveu uma melhor orientação das fibras colágenas, como também uma melhor espessura e uma menor predominância do colágeno tipo I em comparação com o colágeno tipo III.

3.4.4 – Nanoemulsão

A nanoemulsão pode ser denominada como um sistema coloidal composto por dois líquidos heterogêneos. Essa tecnologia envolve nanopartículas, que corresponde um tamanho entre 20 a 500 nm, de um elemento disperso em um meio dispersante (MCCLEMENTS, 2012).

Esse sistema é basicamente formado por água, óleo e surfactante. O surfactante será o responsável por fazer a ligação entre água e óleo. Em algumas situações, para que se tenha uma tensão interfacial negativa, será necessário a adição de um co-surfactante, como por exemplo, o polietilenoglicol (KUMAR et al., 2019).

A nanoemulsão pode ser formulada como óleo em água ou água em óleo. Geralmente, utiliza-se a formulação do tipo óleo em água (CHEN et al., 2020). Desta maneira, compreende-se que a nanoemulsão é composta por uma fase aquosa e uma fase oleosa (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020).

A elaboração de uma nanoemulsão consiste na adição de pequenas gotículas de um óleo, as quais são inertes ao processo de floculação, em um meio aquoso. Além disso, adiciona-se o surfactante que através da utilização de técnicas de baixa energia ou de alta energia estabiliza os componentes físico-químicos da solução nanoemulsionada (DEMISLI et al., 2020).

Os métodos de baixa energia necessitam do trabalho de um surfactante com a finalidade de obter uma emulsificação natural entre óleo e água. Esses procedimentos correspondem aos métodos de técnicas de temperatura de inversão de fase (PIT), composição de inversão de fase (PIC), ponto de inversão de emulsão (EIP) e autonanoemulsificação (GONÇALVES et al. 2018).

Em contrapartida, os métodos de alta energia empregam a utilização de equipamentos mecânicos para resultar na nanoemulsão, estes métodos propiciam fortes forças disruptivas, que geram o fracionamento de uma grande gota e ocasionam gotas nanométricas e produzem nanoemulsões com alta energia cinética. Dentro dos métodos mais utilizados, destacam-se as técnicas de homogeneização de alta pressão, microfluidização e ultrassonicação (GHARIBZAHEDI et al. 2019).

3.4.5 – Fisioterapia

Além disso, a fisioterapia neurológica possui papel primordial na recuperação desses pacientes acometidos pela lesão medular e espasticidade como consequência, preocupando-se com a redução excessiva da atividade destes músculos espásticos e promover maior independência funcional. O objetivo principal do tratamento fisioterapêutico é preparar, manter ou aprimorar a função motora, bem como a qualidade do movimento, por meio do controle da espasticidade e promovendo um maior e correto recrutamento muscular, sempre visando proporcionar o máximo de independência funcional. (THIBAUT et al., 2013; TROMPETTO et al., 2014; FEINBERG; HOULÉ, 2015)

A terapêutica mais utilizada nos pacientes espásticos é a Cinesioterapia associada a utilização de técnicas de relaxamento, inibição, exercícios passivos e ativos para reduzir as reações irregulares de movimento, em consequência das alterações tônicas, além de treinamento de marcha em solo ou esteira. O treinamento de marcha em esteira possui uma atividade fundamental de neuroproteção, aumento da plasticidade do córtex motor e proporcionar efeitos positivos na neuroplasticidade auxiliando na recuperação funcional dos indivíduos. Com isso, o intuito é proporcionar aos pacientes uma melhor qualidade no controle do movimento, realizando a prevenção de posturas motoras anormais, modulação tônica e prevenção das contraturas e deformidades (AHUJA et al., 2017).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Tipo do estudo

Pré-clínico, cego com abordagem analítica quantitativa.

4.2 - Local da Pesquisa

Laboratório de Estudos Biológicos e Produtos Naturais, Biotério e Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental do Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes.

4.3 - Aspectos Éticos

O projeto foi submetido para análise da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA e aprovado sob o parecer de N°040615 (ANEXO 1).

4.4 - Nanoemulsão

A nanoemulsão com partículas lipídicas foi confeccionada com 0.017g de polímero, 0.005 g de OEAz, 10 ml de acetona (que evapora), incorporadas pelo método solução-gel utilizando 0.02 g de pluronic® (agente estruturante da nanoemulsão são copolímeros à base de óxido de etileno e óxido de propileno; Merck-Sigma-Aldrich/ Brasil) e 20 ml de água.

Onde 0.005g de OEAz em 20 ml de água corresponde a 25% de concentração (SEVERINO et al., 2012).

4.5 - Amostra e tratamento

Foram utilizados 18 ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos, machos e fêmeas, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Apresentaram peso entre 250 e 300 gramas. Eles foram divididos de acordo com seu gênero e agrupados em número de 2 aleatoriamente em gaiola de polipropileno, ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo NanoAlpinia, produzido com OEAz (25%) em formulação de nanoemulsão, cujo carreador foi constituído de partículas lipídicas; Grupo Ziclague® (doador pela Indústria Farmacêutica Hebron®, Brasil) ministrado por via tópica (0,025mg/Kg em gastrocnêmios), grupo Lesão – sem tratamento medicamentoso e o Grupo Sadio.

4.6 - Procedimento Cirúrgico

Foi utilizado um modelo experimental adaptado de acordo com o estudo de Torres et al. (2010) e Osborn et al. (1990), seguindo as normas de pré e pós-operatório do *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS). Os animais foram pesados e administrado Cloridrato de Ketamina a 10% (95mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal. Após a anestesia, os animais foram colocados em decúbito ventral com exposição do dorso para realização da antisepsia na parte torácica com uso da solução de polivinil pirrolidona e logo após a tricotomia. Posteriormente foi realizado uma incisão de aproximadamente 5cm de comprimento de pele e tecido subcutâneo sob linha média da região torácica, com afastamento subperiosteal dos paravertebrais, com a finalidade de expor a coluna vertebral.

Para evidenciar o canal medular, foi realizado a localização das vertebbras T9 e T10 por meio de palpação, e posteriormente realizado a laminectomia dos mesmos. Logo após houve a realização do trauma mecânico por meio do aparelho estereotático modificado, que foi produzido pelos pesquisadores e constitui-se de uma haste fina de ponta romba (01mm²) com peso de 70g localizado na parte superior, colocado por 5 minutos em contato com a medula.

Na sequência, realizou-se a sutura da camada muscular e pele, utilizando o fio 3.0 de poliamida monofilamento não absorvível, com aplicação profilática da antibioticoterapia usando Pentabiol a 0,1ml/100g. Após o término da cirurgia, os animais foram encaminhados as suas gaiolas em ambiente climatizado com livre acesso a água e ração.

4.7 - Protocolo de Tratamento

Segundo Li e Bennett (2003) e Murray et al. (2010), a espasticidade começa a surgir após 14 dias de lesão medular. Com isso o treino de marcha foi iniciado com 16 dias pós-operatório (DPO), onde a hipertonia já se encontrava estabelecida. Inicialmente todos os grupos foram submetidos a caminhada diária realizada uma vez por dia, em uma esteira rolante com velocidade de 20cm/s durante 5 minutos sem receberem outro tipo de intervenção. Nos grupos *NanoAlpinia* e Ziclague®, a utilização apenas da esteira durou 59 dias e com 75 DPO deu-se início a associação do treino de marcha com o tratamento medicamentoso sendo aplicado por via dérmica, nos músculos gastrocnêmios na dose de 0,025mg/Kg, ao total de 35 dias, finalizando no 110 DPO. O grupo Lesão-Esteira permaneceu realizando apenas a esteira até o final do tratamento (110 DPO).

PROTOCOLO DE TRATAMENTO				
	Sadio	Lesão-Esteira (n=6 ratos)	Ziclague® (n=6 ratos)	<i>NanoAlpinia</i> (n=6 ratos)
16 DPO	Sem tratamento	Esteira	Esteira	Esteira
75 DPO	Sem tratamento	Esteira	Esteira + medicamento	Esteira + medicamento
110 DPO	Sem tratamento	Esteira	Esteira + medicamento	Esteira + medicamento

4.8 - Avaliação da espasticidade

A avaliação ocorreu por meio da *Escala de Ashworth* (BOHANNON; SMITH, 1987; HAHM et al., 2015; ANEXO 2), nos respectivos tempos 16º, 75º e 110º DPO, com o objetivo de quantificar o grau de espasticidade dos animais. Esta escala apresenta escores que vão de 0 a 4, em que 0 significa o não aumentos do tônus, 1 o leve aumento do tônus no início ou no final do movimento, 2 o aumento do tônus em mais ou menos de 50% do movimento, 3 um acentuado aumento do tônus para flexão ou extensão e 4 - rigidez em flexão ou extensão.

4.9 - Avaliação Comportamental

A escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB; ANEXO 3) foi desenvolvida e validada para avaliar a capacidade locomotora pós-lesão medular. Possui algumas vantagens como exemplo: 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 (SANTOS et al., 2011). O teste apresenta escores que variam de 0 a 22, quantificando de maneira convincente a recuperação motora no TRM e foi realizado no 16º, 75º e 110º DPO (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995; MOLINA et al., 2015; SEDÝ et al., 2008).

4.10 - Preparação das amostras para estudos histológicos e Fixação

As amostras foram submetidas a eutanásia em câmara de dióxido de carbono (CO²), para retirada e posterior análise histológica do músculo gastrocnêmio. Os músculos gastrocnêmios, de forma bilateral, foram dissecados da junção musculotendinosa na conexão do osso calcâneo para análise histomorfológica.

Os músculos foram postos em formaldeído (10%) e, em seguida, foram fixados em parafina. As secções histológicas em série (5 µm) foram preparadas por meio de técnicas laboratoriais rotineiras e após procedimentos foram fixadas à lâmina de vidro (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2004).

Para tanto, o material passou por processo de desidratação e clareamento. A desidratação foi realizada por meio de banhos de álcoois em crescentes concentrações (70%, 95%, 95%, 100%, 100%) e para o clareamento foram utilizadas três imersões em solvente orgânico (Xilol I, Xilol II e Xilol III), que proporciona transparência ao tecido e prepara o tecido para inclusão em parafina. Ao receber a parafina, o tecido torna-se envolto por um bloco solidificado, que posteriormente sofreu cortes seriados (tênis) com 5 µm de espessura. As tênis foram colocadas em banho histológico com água em temperatura de 50 °C para auxiliar no estiramento do tecido e sua fixação nas lâminas (RIZELIO et al., 2010).

Após o processo de fixação do tecido à lâmina de vidro, foram aplicados diferentes processos de coloração, com a finalidade de visualizar seus componentes histológicos. A coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) foi realizada para visualização do citoplasma e núcleo muscular. Na técnica de coloração Picrossírius, o padrão de neoformação do colágeno foi analisado por meio dos contrastes esverdeado ou amarelo-esverdeado para identificar o colágeno do tipo III (imaturo) e alaranjado ou avermelhado para colágeno do tipo I (maduro).

4.11 - Quantificação do trofismo muscular, neurônios, astrócitos e células gliais integras

As imagens serão obtidas por meio de uma câmera fotográfica Euromex (CMEX5_WiFi) aumento de 5X e/ou 40X utilizando o *software* ImageFocus Alpha\64,

acoplada a um microscópio de luz (Euromex iScope, IS.1053-PLPOLi) modelo triocular. Para que a análise histológica seja realizada às cegas quanto ao grupo experimental, os códigos de identificação de cada lâmina serão cobertos por outro experimentador antes do início da análise e revelados após seu término. As regiões serão identificadas de acordo com o tecido, porém codificadas. No tecido muscular foi capturado feixes musculares em cortes transversais. E na medula se capturará o corno anterior, também em corte transversal, onde se fará marcação de quadrante de área de contagem de motoneurônios, astrócitos e células gliais integras.

Para análise quantitativa da área, foi utilizado o programa Image J versão 1.8.0, que consiste em um programa de análise de imagens desenvolvido pela National Institute of Health, disponibilizado em domínio público e gratuito (RASBAND; FERREIRA, 2012). Para os pixels serem normalizados as imagens que foram selecionadas serão duplicadas e simplificadas inicialmente em uma imagem homogenia. Foi aplicado background de 30 pixels com escala variando de 0 (mais escuro) a 255 (mais claro).

A análise do quantitativo e tamanho de tecido e espaço endomicial serão aplicados nos músculos estriados com calibração para micrômetros. Seguidamente na quantificação de neurônios também haverá calibração para o tamanho em área determinada que limitará e garantirá quantificação igualitária as amostras.

4.12 - Quantificação de colágeno

A imagem foi decomposta em RGB, que é a abreviatura do sistema de cores aditivas formado por vermelho (*Red*), verde (*Green*) e azul (*Blue*). A escala de RGB varia de 0 (mais escuro) a 255 (mais claro). O RGB converte a imagem em escalas de cinza nos 3 sistemas de cores. Foi utilizada a imagem em escala de cinza na cor vermelha, já que esta representou melhor vermelha - alaranjada e escala de cinza cor verde, destacando melhor a cor verde da amostra. A figura 2a ilustra a imagem real de uma amostra em Picrossírius, comparada à imagem convertida em escala de cinza na cor vermelha pelo Gimp® (Figura 2b).

Observou-se que a área de interesse, ou seja, células marcadas com vermelha estão na cor preta de tonalidade mais forte; já o *background* está em tons de preto desbotado, cinza ou branco. Em seguida, a imagem em escala de cinza na cor vermelha foi analisada no ImageJ®, a segmentação é realizada manualmente e padronizada com a *mask* Li disponível no plugin. E através do plugin *threshold*, selecionou-se a área de interesse. O *software* torna vermelha esta área. A figura 2c mostra a imagem segmentada com seleção da cor vermelha já convertida em vermelha. Definida a área de interesse, pode ser utilizado

o analisador de área do ImageJ® para calcular a área após ajuste apropriado da escala, seguindo a metodologia usada no estudo de Santana *et al.* (2009).

4.12 - Análise estatística

Os dados foram tabulados pelo programa *Microsoft Excel 2011*. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, considerando $p < 0,05$. Para análise de dados paramétricos do tempo e escores após tratamento das variáveis independentes, entre grupos, foi aplicado o teste ANOVA TWO-WAY seguido do pós-teste de Tukey. Para dados de uma única variável foi aplicado ANOVA ONE-WAY com pós teste Tukey e para os não-paramétricos utilizou-se o teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn (com $p < 0,05$ em ambos).

5 - RESULTADOS

A figura 1, evidencia os escores referentes espasticidade muscular desenvolvida após 16 dias de indução de lesão medular. No dia 16º dia, os grupos estavam semelhantes quanto ao nível de espasticidade. Após 75 dias DPO, ocorreu um aumento da espasticidade, apresentando uma resistência em mais de 50% do movimento (escore 2), porém sem diferenças significativas nos grupos. No período de 75 a 110 dias, quando iniciou o tratamento com nanoemulsão e fitomedicamento em seus respectivos grupos, houve uma redução significativa dessa espasticidade com escore semelhante ao 16º dia, apresentando somente hipertonia ao início ou final do movimento nos grupos tratados Ziclague e NanoAlpinia com médias $1,12 \pm 0,12$ e $1,3 \pm 0,15$ respectivamente ($p < 0,01$). O grupo Lesão-Esteira após o período de tratamento continuou em crescente no seu grau de espasticidade de forma significativa ($p < 0,01$). Diferentemente ao grupo sadio que se manteve sem alteração ao treino em esteira.

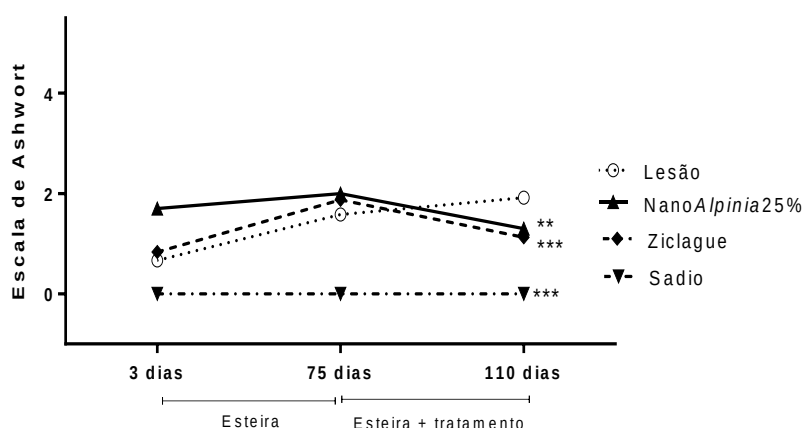


Figura 1: Análise da espasticidade (*Escala de Ashworth*) em modelo murino de lesão medular pós 35 dias de tratamento com *NanoAlpinia25%*. Teste ANOVA TWO-WAY, pós teste Tukey, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

A figura 2 ilustra a capacidade funcional para a marcha segundo os escores do BBB durante as 3 fases do tratamento. Foi constatado que todos apresentaram um aumento nos valores entre si, do 3° ao 75° dias, decorrente à indução realizada na esteira sem associação de tratamentos, porém sem diferenças significativas. Ao iniciar o tratamento no espaço de tempo entre 75° e 110° dias, observou-se que o grupo lesão-esteira demonstrou poucos ganhos funcionais, com média de $13 \pm 3,61$, resultando em uma diferença significativa em relação ao grupo Sadio. O grupo Ziclague® obteve média de $20 \pm 4,05$ ($p < 0,001$) com aumento significativo de ganho funcional para a marcha, quando comparado ao grupo Lesão-Esteira, refletindo diretamente em maior nível funcional dos animais e chegando a níveis semelhante ao grupo sadio. Assim como o grupo *NanoAlpinia*, que obteve média de $18,00 \pm 1,54$ prevalecendo sobre o grupo lesão-esteira ($p < 0,001$).

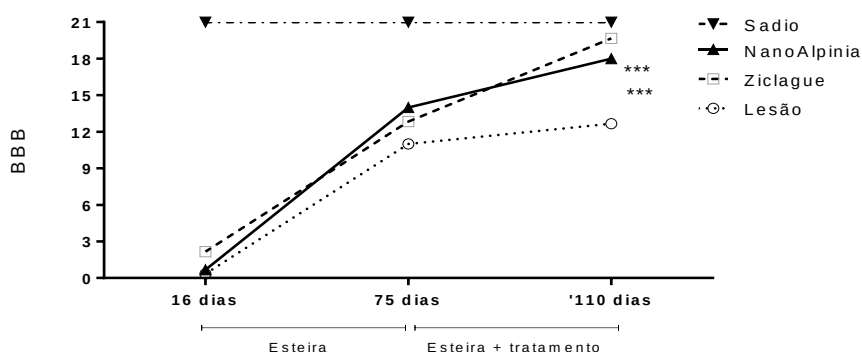


Figura 2: Teste de BBB em modelo murino de lesão medular pós 35 dias de tratamento com *NanoAlpinia*25%. Teste ANOVA TWO-WAY, pós teste Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A figura 3, referente as fibras de colágeno do tipo I e III, demonstra que houve redução significativa do percentual de colágeno do tipo I nos grupos *NanoAlpinia* e Ziclague® apresentando média de $3,49 \pm 3,12$ e $2,47 \pm 1,04$ respectivamente em comparação com Lesão-Esteira $13,73 \pm 4,81$, refletindo na melhora do nível funcional ($p < 0,05$). O grupo lesão-esteira apresentou a maior concentração de colágeno do tipo I em comparação ao grupo Sadio ($p < 0,001$). Com relação ao colágeno do tipo III, não houve diferença entre eles.

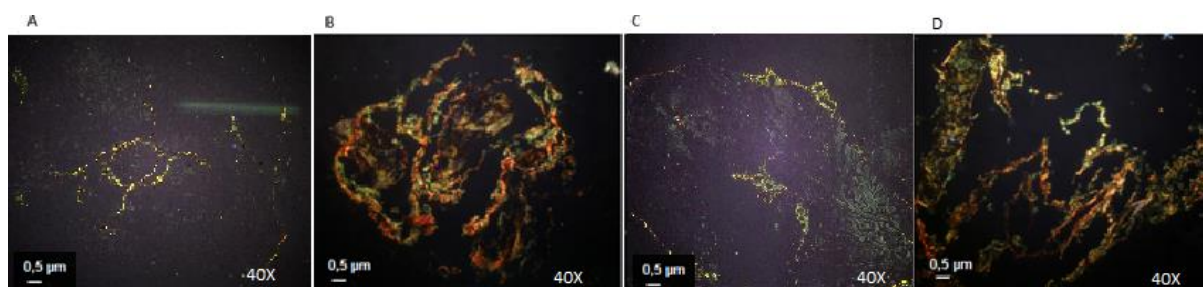
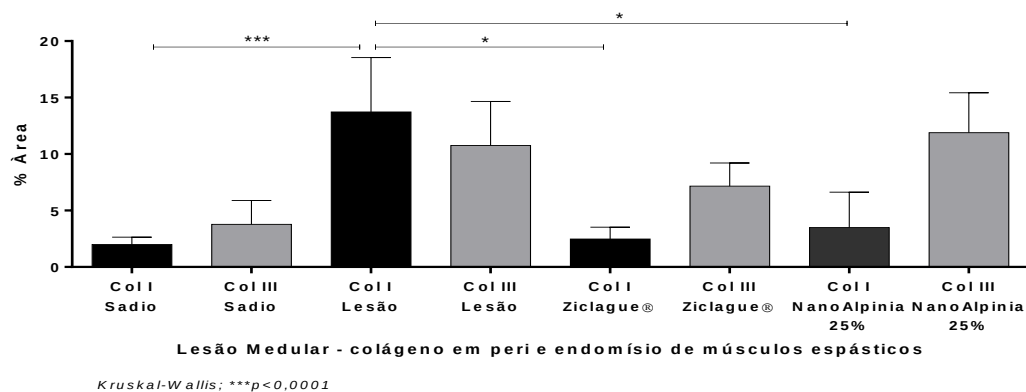


Figura 3: Área (%) e tipo de colágeno em músculos gastrocnêmios espásticos tratados por 35 dias com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* associado a esteira em modelo murino de lesão medular crônica. Corte transversal em ocular de 40X desses músculos evidenciando distribuição e tipo de colágeno em grupo Sadio (A), Lesão (B), Ziclague (C), NanoAlpinia (D). Onde coloração verde-amarelo evidencia colágeno tipo III e coloração amarelo-vermelho evidencia colágeno tipo I. Teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn e ANOVA ONE-WAY com pós teste Tukey, respectivamente, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A figura 4 apresenta a espessura de colágeno no endomísio e perimísio. Com relação ao endomísio, foi encontrado no grupo lesão-esteira maior grau de espessura do espaço endomicial com média de $1,21 \pm 0,97$ quando comparado aos grupos Ziclague ($0,59 \pm 0,16$), NanoAlpinia ($0,71 \pm 0,23$) e sadio ($0,025 \pm 0,08$), refletindo elevado grau de hipotrofia muscular do grupo lesão-esteira, embora os grupos Ziclague e NanoAlpinia também apresentaram maior espessura no endomísio quando comparado ao grupo Sham ($p < 0,001$), porém demonstrando menor indicação de hipotrofia muscular quando comparado ao grupo Lesão. Em relação ao perimísio foi verificado um aumento significativo de sua espessura nos grupos Lesão-Esteira ($3,14 \pm 1,47$), Ziclague ($2,91 \pm 0,97$) e Nanoalpinia ($2,61 \pm 0,93$) em comparação ao grupo Sadio ($0,56 \pm 0,16$) ($p < 0,001$).

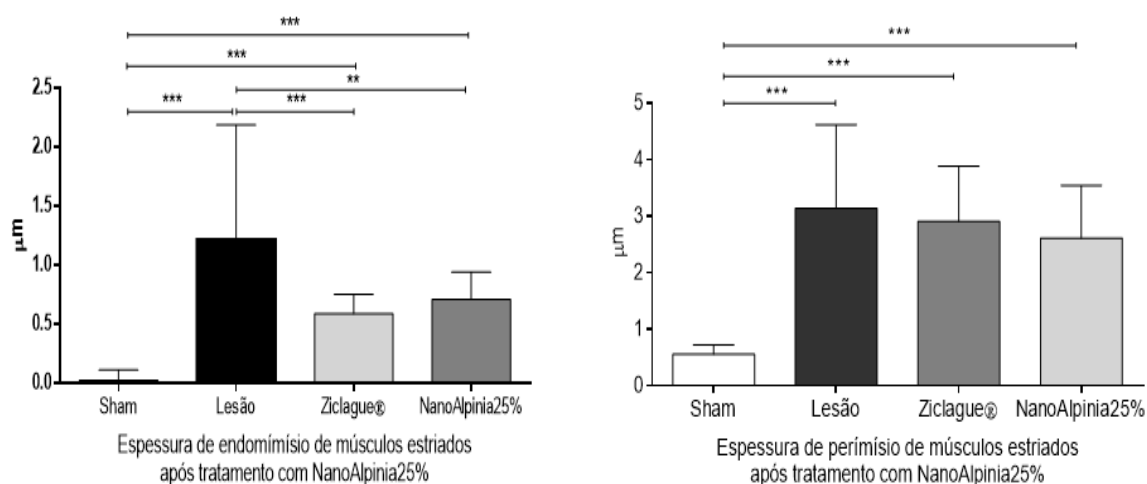


Figura 4: Espessura em endomísio e perimísio nos músculos gastrocnêmios espásticos tratados por 35 dias com óleo essencial da *Alpínia zerumbet* associado a esteira em modelo murino de lesão medular crônica. Teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn e ANOVA ONE-WAY com pós teste Tukey, respectivamente, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 4: Espessura em endomísio e perimísio nos músculos gastrocnêmios espásticos tratados por 35 dias com óleo essencial da *Alpínia zerumbet* associado a esteira em modelo murino de lesão medular crônica. Teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn e ANOVA ONE-WAY com pós teste Tukey, respectivamente, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A figura 5 refere-se aos resultados ligados aos motoneurônios, sua atividade e ao perímetro dos axônios sensitivos. Referente ao quantitativo de motoneurônios vivos ocorreu semelhança entre o número de motoneurônios entre os grupos lesão-esteira, Ziclague e NanoAlpínia. Porém o grupo Sadio se apresentou com maior número de neurônios de forma significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos lesionados.

Em referência a densidade integrada de pixels dos motoneurônios vivos sitiados no corno anterior das medulas após período de tratamento. Foi encontrado uma possível maior atividade metabólica nos motoneurônios dos grupos Ziclague e NanoAlpínia em comparação com o grupo Lesão-Esteira ($p < 0,05$). Os grupos Ziclague e NanoAlpínia apresentaram as médias $1,370e+007 \pm 8,368e+006$ e $1,160e+009 \pm 4,466e+009$, já o grupo lesão-esteira $1,646e+009 \pm 4,440e+009$. O grupo sadio por não ter sofrido nenhuma lesão apresentou baixa densidade integrada evidenciando menor média de pixels na coloração em HE, que consta célula com mais atividade celular de forma significativa em relação aos grupos Lesão-Esteira, NanoAlpínia. ($p < 0,001$, respectivamente) e Ziclague ($p < 0,01$).

Em relação ao perímetro dos axônios sensitivos, foram encontradas reduções no grupo lesão-esteira ($p < 0,001$), Ziclague ($p < 0,001$) e NanoAlpínia ($p < 0,001$) em relação ao

grupo Sadio de forma significativa, além de predomínio de axônios de maior perímetro nos grupos Ziclague ($p<0,001$) e Nano*Alpínia* ($p<0,05$) em comparação ao grupo lesão-esteira.

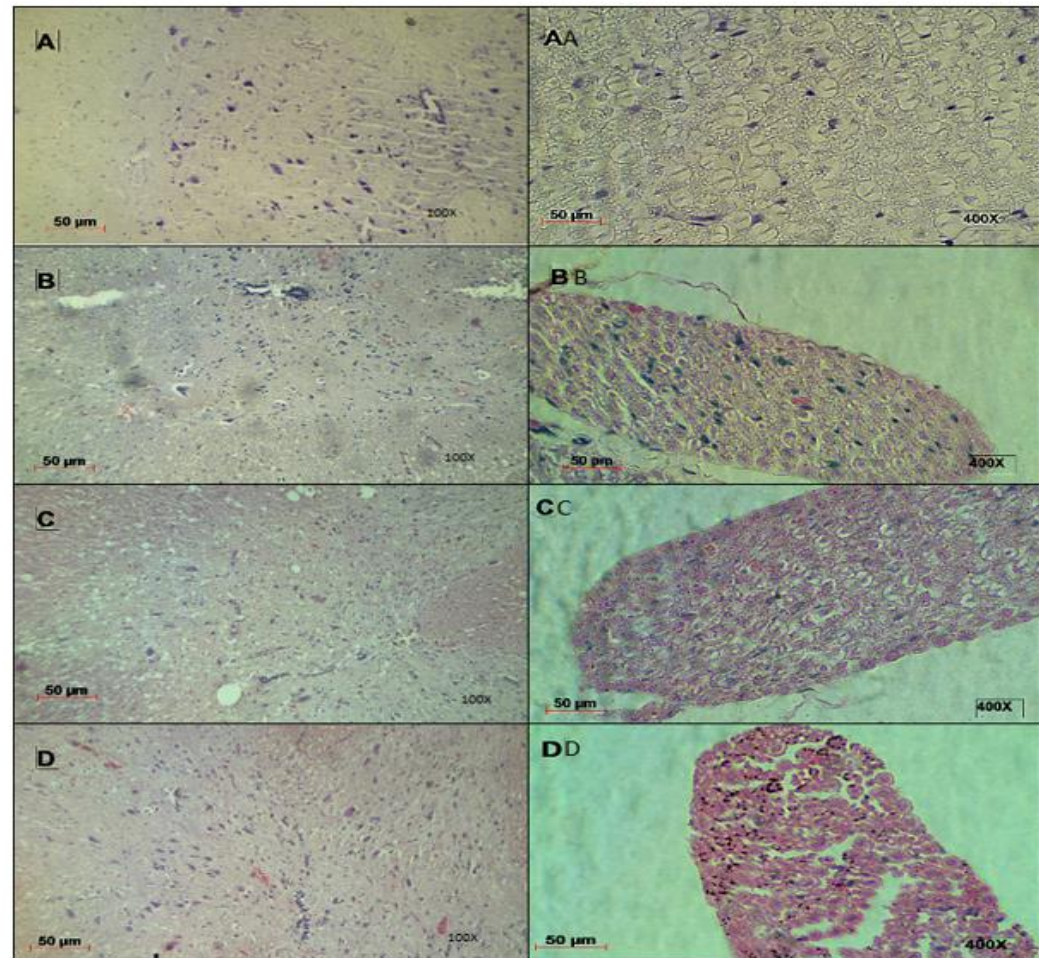
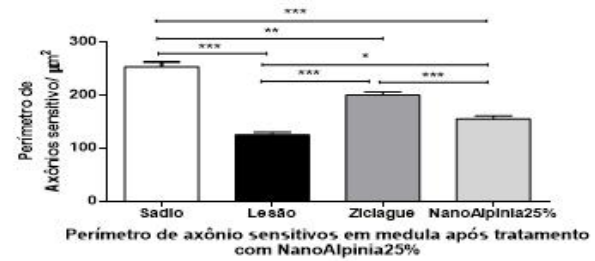
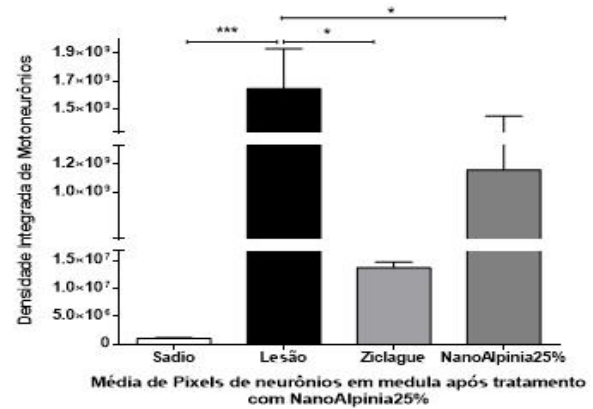
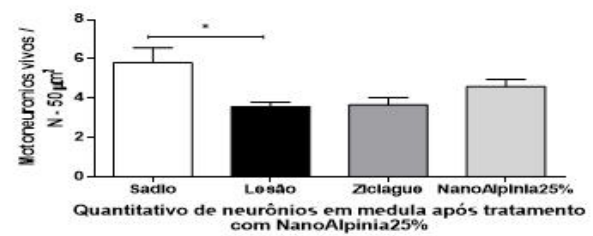


Figura 5: Quantidade e densidade Integrada de motoneurônios motores em área de $50 \mu\text{m}^2$ e perímetro em μm^2 de axônios sensitivos vivos em modelo murino de lesão medular pós 35 de tratamento com *NanoAlpinia25%*. As figuras A, B, C, D mostram o corno anterior da medula espinhal na ocular de 100x e as figuras ao lado referentes aos nervos sensitivos na ocular de 400x. Sadio (A), Lesão (B), Ziclague (C), NanoAlpinia (D). Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

De acordo com a figura 6 que expõe o número de astrócitos vivos na região da medula espinhal, foram encontradas diferenças significativas entre o grupo Sadio e Lesão-Esteira ($p < 0,001$). Com relação ao quantitativo de células gliais vivas na medula espinhal, constatou-se que não houve diferenças significativas entre os grupos, no entanto o grupo Ziclague apresentou um maior número de células da glia.

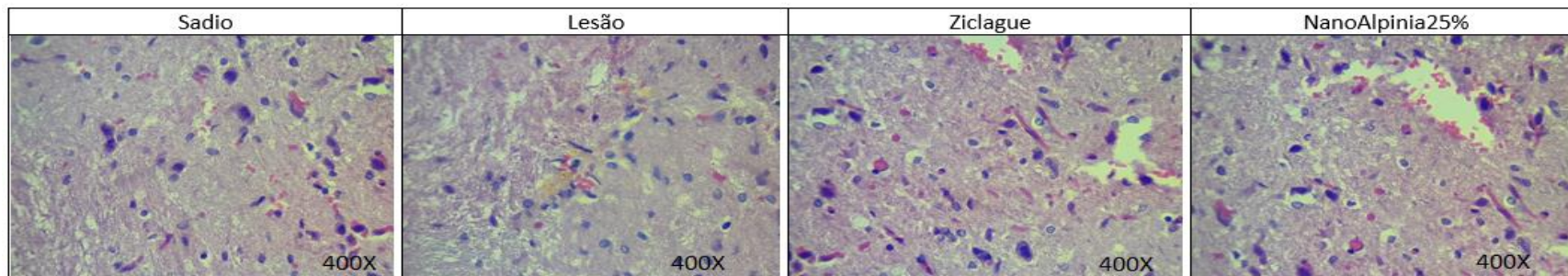
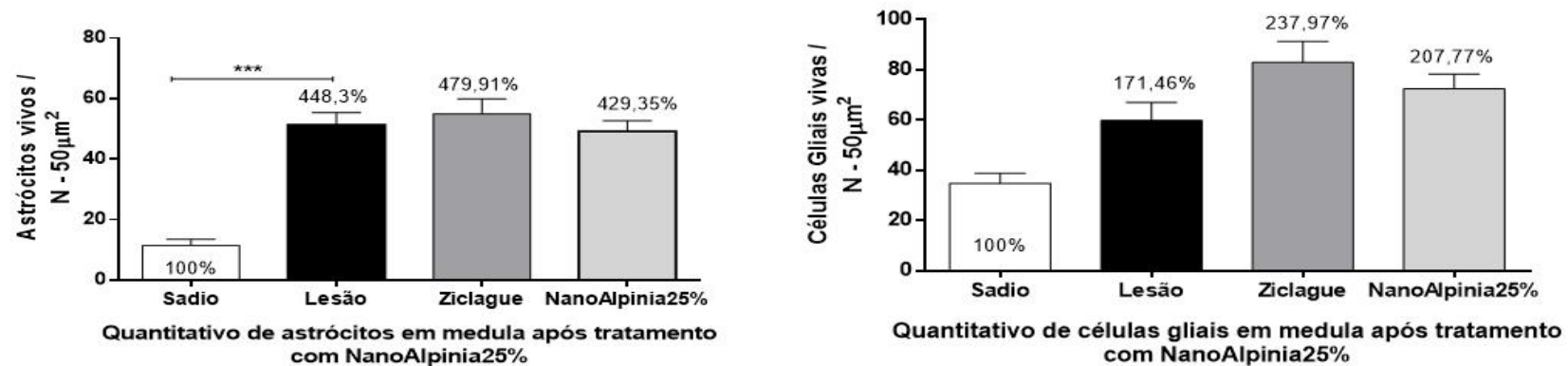


Figura 6: Quantitativo de astrócitos e células gliais em área de 50 μm^2 em modelo murino de lesão medular pós 35 de tratamento com *NanoAlpinia*25%. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6 – DISCUSSÃO

No presente estudo, todos os animais foram submetidos à compressão mecânica da medula espinhal utilizando o modelo experimental de Torres et al. (2010), resultando em lesão incompleta de forma moderada nas fibras neurais, provocando assim uma paraparesia moderada nas patas traseiras dos animais. No atual estudo, apenas o grupo Sadio não foi submetido a reprodução do trauma mecânico, refletindo nos altos escores obtidos na escala BBB desde a primeira avaliação.

Os demais grupos que sofreram compressão medular, apresentaram melhora semelhantes durante o período que foram submetidos ao treinamento somente em esteira, porém com déficits ligados ao equilíbrio, suporte de peso, alinhamento, coordenação e simetria durante a realização dos movimentos. Essa evolução na deambulação, se explica através do processo de plasticidade neural, na qual através da repetição sem correção do movimento, é adotado um padrão de marcha patológico decorrente de alteração no controle motor (LI, 2017).

Após início da utilização do fitomedicamento e *NanoAlpínia*, ocorreu um maior ganho na funcionalidade destes animais chegando a níveis semelhantes ao grupo sadio como consequência da redução da espasticidade, que permitiu a melhora na movimentação dos animais, justificado pelo estudo de Scalzo et al., (2010) os quais constataram que a redução da espasticidade propicia melhora na flexibilidade muscular, favorece a diminuição do surgimento de contraturas neuromiogênicas e com isso proporciona o ganho de funcionalidade.

Ilha et al. (2019), constataram que o treino de marcha em esteira após 14 dias DPO em animais pós lesão medular incompleta, reflete em uma recuperação precoce e evolução da função locomotora, além de favorecer a melhora da neuroplasticidade do córtex motor, repercutindo diretamente no aperfeiçoamento da funcionalidade.

Corroborando com o estudo supracitado, Sun et al. (2013), observaram que os animais submetidos ao treino em esteira demonstraram uma melhora significativa na função inicialmente e começando a entrar num platô nos seus escores funcionais após 6 semanas de treinamento. Como visto no presente estudo, uma vez que inicialmente todos os animais apresentaram ganhos semelhantes, porém no período de 75° até 110° DPO, o grupo que ficou somente no treinamento em esteira apresentou uma estabilização nos seus ganhos funcionais em comparação com os grupos que receberam tratamento associado.

Referente a análise do grau de espasticidade muscular mensurado pela *Escala de Ashworth* modificada, no presente estudo, foi constatada a presença da espasticidade no

16° DPO em todos os grupos que passaram pelo procedimento de trauma, corroborando com os achados de Li e Bennett (2003) e Murray et al., (2010), que relataram o período necessário para a espasticidade se estabelecer no músculo, ocorrendo em média duas semanas após a lesão.

Após iniciado o período de tratamento com o fitomedicamento e *NanoAlpínia* em seus respectivos grupos, ocorreu uma redução nos seus escores verificados por meio Escala de *Ashworth* ao final do período de tratamento, apresentando diferença significativa em comparação com o grupo lesão-esteira e chegando a apresentar valores menores do que encontrados inicialmente.

Essa redução é justificada pelo fato que os dois fitofármacos utilizado têm em sua composição o OEAz, sendo ele, segundo os estudos de Cândido e Xavier-Filho (2012), Maia et al. (2016), Cândido et al. (2017a) e Cândido et al., (2017b), um potente modulador do influxo exagerado do cálcio nos canais de cálcio tipo L, controlando assim a hiperexcitabilidade do músculo e como consequência obtendo a diminuição do quadro de espasticidade e melhora na qualidade do recrutamento e contração muscular.

Assim como foi encontrado no estudo de Santos et al. (2011), que confirmaram a ação moduladora do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* sobre os canais de cálcio do tipo L através de dose dependente, reduzindo o influxo de cálcio no sarcoplasma. Decorrente disso se faz necessário a modulação destes canais Ca^{++} tipo L para redução da hiperexcitabilidade muscular e por consequência o relaxamento muscular, para permitir o ganho de funcionalidade. Oliveira et al. (2018), confirmaram que a redução da espasticidade muscular está ligada ao aumento na funcionalidade dos indivíduos após realização do tratamento com cinesioterapia e utilização do fitomedicamento a base do OEAz.

A utilização da Nanoemulsão no vigente trabalho, teve como objetivo se apresentar como uma possível opção viável para contornar os possíveis efeitos hipotensores causados em pacientes com baixo peso corpóreo espásticos mais leves, decorrente da utilização do fitomedicamento a base da OEAz. De acordo com Cândido et al. (2017), a solução oleosa em relação a emulsão, é a melhor forma de veículo, promovendo uma melhor absorção dérmica. Porém encontrou-se neste estudo que a Nanoemulsão é um veículo tão eficiente quanto a oleosa, já que ambos apresentaram redução semelhantes da hipertonia elástica, mesmo com a Nanoemulsão apresentando uma concentração menor de OEAz em sua composição em comparação com o fitomedicamento.

A nanoemulsão por se tratar de nanopartículas possui maior facilidade para infiltrar-se nas camadas da pele e músculo em comparação a partículas normais de maior tamanho, como visto por Contente et al. (2016), encontraram e descreveram que as nanoemulsões apresentam na fase interna, gotículas de tamanho nanométrico (20 a 200nm), promovendo

maiores vantagens como, melhor espalhamento, penetração cutânea, hidratação e uma liberação de forma gradual e controlada.

É plausível que as modificações morfológicas do colágeno, ocorridas no perimísio e endomísio, altere a mecânica muscular, pois a mesma é organizada em torno de fascículos ou grupos de miofibrilas, apresentando suma importância na transdução de força e rigidez muscular, podendo contribuir direta ou indiretamente para o desenvolvimento de contraturas, exercendo uma importante função nas dificuldades de mobilidade enfrentadas destes pacientes espásticos (BOOTH et al., 2011; DIETZ; SINKJAER, 2007).

A afirmação acima foi revalidada no presente estudo, em que houve, de fato, alteração morfológica do colágeno decorrente da lesão do SNC, expresso por um aumento significativo da sua largura em fibras longitudinais de músculos espásticos no grupo Lesão-Esteira, mais precisamente no endomísio. Em contrapartida, quanto à largura do colágeno no epimísio não houve predomínio entre os grupos Lesão-Esteira, Ziclague® e NanoAlpinia.

A diminuição significativa na concentração de colágenos do tipo I no grupo Ziclague e Nanoalpinia reflete a melhora da performance funcional destes animais, como encontrado por Smith et al. (2011) na qual constataram que o musculo espástico apresenta um acúmulo no teor de colágeno do tipo I, desorganização na orientação destas fibras e como consequência favorece a elevação da rigidez passiva muscular e articular, comprometendo a funcionalidade dos indivíduos.

Legitimando a afirmação acima, Cerqueira et al. (2015), observaram que após o período de tratamento em conjunto na utilização do Fitomedicamento a base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* e cinesioterapia, ocorreu uma redução significativa nas fibras de colágeno do tipo I, bem como uma reversão na espessura e na organização destas fibras de colágeno, favorecendo a uma maior flexibilidade na estrutura do endomísio, favorecendo a melhora na performance funcional dos animais do estudo.

Smith et al. (2019), evidenciaram que a presença de alto níveis de colágeno do tipo I e proteoglicanos totais possuem uma alta correlação com o aumento da rigidez dos músculos espástico e diminuição da funcionalidade, além disso, verificaram o colágeno do tipo III como um preditor negativo para a rigidez muscular, favorecendo a evolução da cinemática dos pacientes, corroborando com os achados relacionados aos níveis de colágeno e função dos animais no presente estudo.

Os resultados encontrados sobre os motoneurônios, foram vistos que não houve uma diferença significativa no quantitativo entre os grupos, porém os grupos que foram tratados com o fitomedicamento a base de OEAz e nanoemulsão, apresentaram uma possível maior atividade metabólica deste motoneurônios em comparação com o grupo lesão-esteira.

Marques et al., (2018), detectaram que o treinamento em esteira tardio promove recuperação funcional relacionada com uma maior área de preservação dos motoneurônios no corno ventral da medula espinhal e preservação de maior região de fibras musculares, reduzindo os níveis de atrofia, promovendo qualidade na atividade funcional dos animais.

A utilização do treinamento em esteira, demonstrou que ocorre uma redução na quantidade de neurônios motores apoptóticos em região de medula espinhal, desempenhando uma função de proteção dos motoneurônios distais em nível genético como visto por Wu et al. (2016), contribuindo na prevenção de lesões secundárias nos neurônios motores e estimular a recuperação das funções motoras dos animais.

Segundo Gazula et al. (2004) os motoneurônios privados de estimulação excitatória de entradas corticais descendentes e do tronco cerebral exibem atrofia exacerbada da árvore dendrítica e a realização de treinamento agudo por meio de exercícios realizados em dispositivo motorizado durante 5 dias, ajudam na minimização destes efeitos atroficos.

Com relação aos resultados encontrados no presente estudo, sobre a presença dos astrócitos é possível observar que o grupo Lesão-esteira obteve um maior número de astrócitos em comparação com o grupo sadio, porém sem diferenças significativas entre os grupos tratados quando comparados.

Já as células gliais se apresentaram elevadas no grupo Ziclague em comparação com o grupo Sadio devido a busca para realizar o processo de remielinização dos axônios para execução de sinapses de qualidade, bem como visto os axônios sensitivos do grupo Ziclague se apresentaram com os maiores perímetros, corroborando com estudo de LI; LEUNG (2015), que relataram a atividade dos oligodendrócitos que optam por realizar o processo de remielinização em axônios de maior calibre, refletindo diretamente na qualidade e potência na condução de impulsos nervosos ocasionando melhores resultados na cinemática dos animais.

Zou (2021), afirma que se faz necessário a realização do treinamento locomotor contínuo após a lesão medular, para contribuir no crescimento dos axônios e seus brotos lesionados ou intactos, na promoção de novas sinapses ou atuando na mudança das conexões sinápticas preexistentes para gerar efeitos positivos na função motora dos animais.

Após a ocorrência da lesão, foi observado por Liddelow et al. (2017) que a presença dos astrócitos reativos do tipo I podem ser considerados prejudiciais para recuperação funcional em consequência das suas atividades neurotóxicas, que influencia diretamente na morte de oligodendrócitos maduros e um subconjunto de neurônios do SNC,

além de afetarem diretamente a realização das sinapses, resultando em uma ineficiência na execução e manutenção dos impulsos nervosos.

Os astrócitos reativos do tipo II atuam de forma positiva em inúmeros fatores neurotróficos e promovem fortemente a sobrevivência neuronal e reparação tecidual, como visto nos estudos de Hassanzadeh et al. (2021), Liddelow et al. (2017) e Okada et al. (2006), encontraram que a presença dos astrócitos tipo II em maior quantidade resultou em um brotamento dos axônios otimizado, refletindo em uma importante recuperação funcional, além de serem relevantes na reparação da barreira hematoencefálica e proteção dos neurônios, consequentemente um melhor prognóstico para funcionalidade.

Corroborando com os achados anteriores Falkener et al. (2004), demonstraram que a perda de astrócitos reativos exacerba a degeneração tecidual e evita uma recuperação funcional motora após lesão medular, além disso, possuem papel importante na cicatrização da medula restringindo a inflamação, realizam proteção dos neurônios e oligodendrócitos.

7 - Conclusão

Conclui-se que a *NanoAlpinia*25% apresentou eficácia semelhantes ao Ziclague, porém em menores concentrações do OEAz em sua composição, mostrando uma significativa redução da hipertonia elástica na musculatura avaliada e progresso nos níveis funcionais de acordo com a escala BBB, além de melhora na orientação e organização das fibras de colágeno e nos seus níveis no perimísio e endomísio. Em nível medular, propiciou um maior número de motoneurônios, astrócitos e células da glia refletindo em uma melhor recuperação e performance funcional dos animais. Desta forma, a *NanoAlpinia* mostra-se como uma possível nova possibilidade terapêutica, pois, foi capaz de apresentar resultados similares ao do medicamento Ziclague® mesmo possuindo uma concentração de 25% do OEAz em sua formulação, diferente do fitomedicamento, que para apresentar esses mesmos efeitos necessita de uma concentração de 33% do OEAz em seu preparo. Além de promover uma liberação controlada da substância ativa, devido ao método de nanoemulsão, que permite uma melhor penetração cutânea, elevando a eficácia terapêutica e tornando o tempo de ação mais prolongado na musculatura espástica.

8 – REFERÊNCIAS

- AHUJA, C. S.; FEHLINGS, M. Concise Review: Bridging the Gap: Novel Neuroregenerative and Neuroprotective Strategies in Spinal Cord Injury. *Stem Cells Translational Medicine*. 2016. 5 (7): 914-24.
- AWAAD, Y.; RIZK, T. Spasticity in children. *J Taibah Univ Med Sci* 2012; 7(2): 53-60.
- 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; v. 14 n. (7): p. 549-51.
- BOOTH, C.M.; CORTINA-BORJA, M.J.; THEOLOGIS, T.N. Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. **Developmental Med Child Neurol**, 2001; v. 43: p. 314–320.
- CÂNDIDO, E.A.F. et al. Correlation of spasticity with functionality of spastic individuals after physiotherapy treatment associated with herbal medicine derived from *alpinia zerumbet*. *International Journal of Development Research*. v.8, n.01, 2018, p. 18443-18447
- CÂNDIDO, E.A.F. et al. Influence of *alpinia zerumbet* essential oil in the kinesiotherapeutic treatment of patients with syndrome pyramidal. *International Journal of Development Research*. v.07, n.10, 2017, p.15837-15843
- CÂNDIDO, E.A.F., XAVIER-FILHO, L. Viabilidade do uso do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, Zingiberaceae, na otimização do tratamento fisioterapêutico em paralisia cerebral espástica. *Arq Bras Neuroci*, v.31, n.3, 2012, p.110-115.
- 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.
- CERQUEIRA, F.L. et al. 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. *Interscience place*, n.4, v.10, 2015, p. 127-206
- CHA, Y.; ARAMI, A. Quantitative Modeling of Spasticity for Clinical Assessment, Treatment and Rehabilitation. *Sensors*. 2020, v.20, n°5046, p-01-22
- CHEN, L. H.; CHENG, L. C.; DOYLE, P. S. Nanoemulsion-Loaded Capsules for Controlled Delivery of Lipophilic Active Ingredients. *Advanced Science (Weinh)*. 2020. 7 (20): 2001677.

CORREA, A.J.C.; LIMA, C.E.; COSTA, M.C.C.D. *Alpinia zerumbet* B.L. Burtt & 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; v.12 n. (1): p. 113-119.

CORRÊA, P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e IBDF, 1975. v.6, 345p.

D'AMICO MJ, MURRAY KC, LI Y, CHAN KM, FINLAY MG, BENNETT DJ, GORASSINI MA. Constitutively active 5-HT₂/α₁ receptors facilitate muscle spasm after human spinal cord injury. *J Neurophysiol.*, 2013, 109:1473-1484.

DEMISLI, S.; MITSOU, E.; PLETSIA, V.; XENAKIS, A.; PAPADIMITRIOU, V. Development and Study of Nanoemulsions and Nanoemulsion-Based Hydrogels for the Encapsulation of Lipophilic Compounds. *Nanomaterials* (Basel). 2020. 10 (12): 2464.

DIETZ, V.; SINKJAER, T. Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics. **Lancet Neurol** 2007; v. 6, n. (8): p. 725-33.

DIMITRIJEVIC, M. R. et al. Neurocontrol of Movement in Humans With Spinal Cord Injury. **Artificial Organs**, v.39, n.10, 2015, p.823-833

ECKERT, M.J. et al. Trauma: Spinal Cord Injury. *Surg Clin N Am* v.97, 2017, p.1031–1045.

ELY, M. R. et al. Reductions in Cardiac Structure and Function 24 Months After Spinal Cord Injury: A Cross-Sectional Study. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. 2021, p: 01-10.

EVANS SH, CAMERON MW, BURTON JM. Hypertonia. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 2017, jul; 47(7):161-86

GAZULA, V, R. et al. Effects of limb exercise after spinal cord injury on motor neuron dendrite structure. **The Journal of Comparative Neurology**. 2004

GHARIBZAHEDI, S. M. T et al. High pressure processing of food-grade emulsion systems: antimicrobial activity, and effect on the physicochemical properties. **Food Hydrocoll.** v. 87, 2019, p:307–320.

GONÇALVES, A. et al. Production, properties, and applications of solid self-emulsifying delivery systems (S-SEDS) in the food and pharmaceutical industries. **Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects**. v.538, 2018, p:108–126.

HACHEM, L. D.; AHUJA, C. S.; FEHLINGS, M. G. Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. *The Journal of Spinal Cord Medicine*. 2017. 40 (6): 665-675.

- HAJJIOUOI, A.; FORTASSI, M.; BOUJRAF, S. Spinal cord injury in the Moroccan healthcare system: A country case study. **IBRO Neuroscience Reports**. v.10, 2021, p:62-65
- HASSANZADEH, S. et al. More attention on glial cells to have better recovery after spinal cord injury. **Biochemistry and Biophysics Reports**. V.25, 2021, p: 01-09
- HERNANDEZ-OCHOA EO, SCHNEIDER MF. Voltage clamp methods for the study of membrane currents and SR Ca (2+) release in adult skeletal muscle fibres. *Prog Biophys Mol Biol.*, 2012, apr, 108(3):98-118.
- IKUMAPAYI, O.M. et al. Microfabrication and nanotechnology in manufacturing system – An overview. **Materials Today: Proceedings**. 2020
- ILHA, J. et al. Overground gait training promotes functional recovery and cortical neuroplasticity in an incomplete spinal cord injury model. **Life Sciences**. v.232, 2019
- KANG, Y. et al. Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. **Journal of Neurorestoratology**, v.6, 2018, p.1-9.
- KIM, Y. H.; HA, K. Y.; KIM, S. I. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. *Clinics in Orthopedic Surgery*. 2017. 9 (1): 1-9.
- KIRSHBLUM, S.C et al. International standards for neurological classification of spinal cord Injury. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v.34, n.6, 2011, p.535-546
- KUMAR, M.; BISHNOI, R. S.; SHUKLA, A. K.; JAIN, C. P. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2019. 24 (3): 225-234.
- LI Y.E.; BENNETT D.J. Correntes de sódio e cálcio persistentes causar potenciais planalto em motoneurônios espinhais de ratos crônicas. **J. Neurophysiol.** v.90, p.857-869, doi: 10.1152 / jn.00236. 2003.
- LI, N.; LEUNG, G. K. K. Oligodendrocyte Precursor Cells in Spinal Cord Injury: A Review and Update. **Biomed Research International**. 2015
- LIDDELOW, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature** v.541, 2017, p:481–487.
- 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*, v.28, 2003, 464-71p.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2001. 1067p
- MA, X. N. et al. An overview of chemical constituents from *Alpinia* species in the last six decades. **RSC Advances**. v.7, 2017, p-14114- 14144.

MAIA, M. O.; DANTAS, C.G.; XAVIER-FILHO, L.; CÂNDIDO, E.A.; GOMES, M.Z. The Effect of *Alpinia zerumbet* Essential Oil on Post-Stroke Muscle Spasticity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016; 118: 58-62.

MARQUES, M. R. et al. Locomotor Training Promotes Time-dependent Functional Recovery after Experimental Spinal Cord Contusion. **Neuroscience**. v.392, 2018, p:258-269

MATHEWSON, M.A.; WARD, S.R.; CHAMBERS, H.G.; LIEBER, R.L. High resolution muscle measurements provide insights into equinus contractures in patients with cerebral palsy. *Journal of Orthopaedic Research* 2015;33(1):33-39

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsões versus microemulsões: terminologia, diferenças e semelhanças. **Soft Matter**. v.8, 2012, p:1719–1729.

MEHRHOLZ, J. et al. Is body-weight-supported treadmill training or robotic-assisted gait training superior to overground gait training and other forms of physiotherapy in people with spinal cord injury? A systematic review. *Spinal Cord*, v.55, 2017, p.722-729

MIAZGA K, FABCZAK H, JOACHIMIAK E, ZAWADZKA M, KRZEMIENÍ-OJAK L, BEKISZ M, BEJROWSKA A, JORDAN LM, SŁAWIŃSKA U. Intraspinal Grafting of Serotonergic Neurons Modifies Expression of Genes Important for Functional Recovery in Paraplegic Rats. *Neural Plasticity*, 2018, jul, 25:1-16.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular. Secretaria de Atenção à Saúde – Departamento de Ações Programáticas Estratégicas**. 1ª edição, Brasília – DF. 2013

Mummaneni, N. et al. Injury volume extracted from MRI predicts neurologic outcome in acute spinal cord injury: A prospective TRACK-SCI pilot study. **Journal of Clinical Neuroscience**. v.82, 2020, p:231-236

Mummaneni, N. et al. Injury volume extracted from MRI predicts neurologic outcome in acute spinal cord injury: A prospective TRACK-SCI pilot study. **Journal of Clinical Neuroscience**. v.82, 2020, p:231-236

MUSTAFA, I. F.; HUSSEIN, M. Z. Synthesis and Technology of Nanoemulsion-Based Pesticide Formulation. *Nanomaterials (Basel)*. 2020. 10 (8): 1608.

NEZHAD, S. V et al. Therapeutics effects of [Pyr1] apelin-13 on rat contusion model of spinal cord injury: An experimental study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. 2021, v.10; p-19-24.

OLIVEIRA, T.V.C.; MENESES, D.C.S.; SANTANA, I.C.J.; FERREIRA, M.E.R.; LEITE, R.N.O.; NETO, J.N.C. et al. Correlation of spasticity with functionality of spastic individuals after physiotherapy treatment associated with herbal medicine derived from

Alpinia zerumbet. International Journal of Development Research 2018; 8(1): 18443-18447.

OLSSON, M.C.; KRÜGER, M.; MAYER, 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.

REINHARDT, D. R. et al. Bilateral cervical contusion spinal cord injury: A mouse model to evaluate sensorimotor function. **Experimental Neurology**. v.331, 2020.

REINHARDT, D. R. et al. Bilateral cervical contusion spinal cord injury: A mouse model to evaluate sensorimotor function. **Experimental Neurology**. v.331, 2020.

RIEMANN, L. et al. Transplantation of Neural Precursor Cells Attenuates Chronic Immune Environment in Cervical Spinal Cord Injury. **Frontiers in Neurology**. v.9, n.428, 2018, p.01-12

ROUANET, C.; REGES, D.; ROCHA, E.; GAGLIARDI, V.; SILVA, G. S. Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment updated. **Arquivo Neuropsiquiatria**. v.75, n.6, 2017, p.387-393

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; v.18 n. (1): p. 539-543.

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.

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

SCHIAFFINO S, SANDRI M, MURGIA M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiol.*, 2007, 22:269-278.

SHAO, A.; TU, S.; LU, J.; ZHANG, J. Crosstalk between stem cell and spinal cord injury: pathophysiology and treatment strategies. *Stem Cells Translational Medicine*. 2019. 10 (1): 238.

SIDDALL, P.J.; MIDDLETON, J.W. Spinal cord injury-induced pain: mechanisms and treatments. **Future Medicine**. 2015

SISCÃO MP; PEREIRA C; ARNAL RLC; FOSS MHDA; MARINO LHC. Trauma raquimedular: caracterização em um hospital público. Spinal Cord injury: characterization. Arquivos de Ciência da Saúde, v14, n.3, 2007, 145-7p.

SMITH LR, CHAMBERS HG, LIEBER RL. Reduced satellite cell population may lead to contractures in children with cerebral palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2013, dec, 55(3):264–70.

SMITH LR, CHAMBERS HG, SUBRAMANIAM S, LIEBER RL. Transcriptional abnormalities of hamstring muscle contractures in children with cerebral palsy. *PLoS One*. 2012, aug, 7(8):e40686.

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. *The Journal of physiology*, 2011, 589:2625-2639

SMITH LR, PONTÉN E, HEDSTRÖM Y, WARD SR, CHAMBERS HG, SHANKAR SUBRAMANIAM S, LIEBER RL. Novel transcriptional profile in wrist muscles from cerebral palsy patients. *BMC Medical Genomics*, 2009, jul, 2:44.

SMITH, L.R.; CHAMBERS, H.G.; SUBRAMANIAM, S.; LIEBER, R.L. Transcriptional abnormalities of hamstring muscle contractures in children with cerebral palsy. *PLoS One* 2012;7(8):40686.

SMITH, L.R.; POTÉN, E.; HEDSTROM, Y.; WARD, S.R.; CHAMBERS, H.G.; SUBRAMANIAM, S. et al. Novel transcriptional profile in wrist muscles from cerebral palsy patients. *BMC Medical Genomics* 2009; 2(44):10–30.

SMITH, R. S. et al. Contribution of extracellular matrix components to the stiffness of skeletal muscle contractures in patients with cerebral palsy. **Connective Tissue Research**. 2019, p:01-12

STEVENSSON, A. G.; BARDOS, J.I.; BROUGHTON, J. The high cost of spasticity in multiple sclerosis to individuals and Society. *Multiple Sclerosis Journal*. 2015, v.12, p-1583-1592

SUN, T. et al. Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**. v.8, n°27, 2013, p:2540-2547

SVENSSON, J.; BORG, S.; NILSSON, P. Costs and quality of life in multiple sclerosis patients with spasticity. *Acta Neurologica*. 2013, p-01-08.

TESCHKE, R.; XUAN, T.D. Viewpoint: A Contributory Role of Shell Ginger (*Alpinia zerumbet*) for Human Longevity in Okinawa, Japan? **Nutrients**. 2018, p-01-22.

TORRES, B. B. J.; SILVA, C. M. O.; ALMEIDA, Á. E. R. F.; CALDEIRA, F. M. C.; GOMES, M. G.; ALVES, E. G. L.; SILVA, S. J.; MELO, E. G. Modelo experimental de

trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec** ,v. p.92-99, 2010.

WINCENTAK, J. et al. The current state of knowledge on digital rectal stimulation in traumatic and non-traumatic spinal cord injury: A scoping review. **Archives of physical medicine and rehabilitation**. 2021

ZOU, Y. Targeting axon guidance cues for neural circuit repair after spinal cord injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v.41, n°2, 2021, p: 197-205.

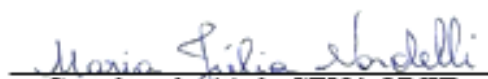
ANEXOS/APÊNDICES



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

DECISAO DA CEUA-UNIT

O protocolo da pesquisa, **“Comportamento funcional de músculos patológicos mediante tratamento da espasticidade muscular com NanoBioproducto a base do óleo essencial da Alpinia zerumbet.”**, processo nº 040515, 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 20 de maio de 2015.



Coordenador(a) da CEUA-UNIT

ANEXO 2 - ESCALA DE ASHWORTH

ESCALA DE ASHWORTH	
0	Tônus normal.
1	Aumento de tônus no início ou final do movimento.
2	Aumento do tônus em +<50% do movimento.
3	Movimentação difícil em flexão ou extensão.
4	Partes rígidas em flexão ou extensão.

ANEXO 3 - ESCALA BBB

PONTUAÇÃO ESCALA BBB	
0	Nenhum movimento observável dos membros posteriores.
1	Movimento suave de uma ou duas articulações, normalmente o quadril e/ou joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e suave de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento suave de todas as três articulações do membro posterior.
5	Suave movimento de duas articulações e extenso movimento de uma terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento suave de uma terceira.
7	Extenso movimento de três articulações do membro posterior.
8	Arrastar da pata sem descarga de peso ou posição plantar da pata sem descarga de peso.
9	Posição plantar da pata com descarga de peso somente quando o membro está apoiado (sem movimento) ou descarga de peso ocasional, frequente ou consistente na passada dorsal e sem passada plantar.
10	Descarga de peso ocasional na passada plantar e nenhuma coordenação entre membros anteriores-membros posteriores (MMAA-MMPP).
11	Descarga de peso frequente a consistente na passada plantar e nenhuma MMAA-MMPP coordenação.
12	Descarga de peso frequente a consistente na passada plantar e coordenação ocasional entre MMAA-MMPP.
13	Descarga de peso frequente a consistente na passada plantar e coordenação frequente entre MMAA-MMPP.
14	Descarga de peso consistente na passada plantar, coordenação consistente entre MMAA-MMPP; e posição da pata predominante ao andar é rodada (internamente ou externamente) no contato inicial com a superfície, assim como quando está levantada no final da fase de balanço; ou passada plantar frequente, coordenação consistente entre MMAA-MMPP e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente, coordenação consistente entre MMAA-MMPP, e nenhuma liberação de dedos ou liberação ocasional durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato inicial com a superfície.
16	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre frequentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato inicial e rodada ao levantar.
17	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre frequentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato inicial e ao levantar.
18	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre consistentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato inicial e rodada ao levantar.
19	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre consistentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato inicial e ao levantar; e a posição da cauda é baixa parte do tempo ou todo tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre consistentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da

	pata predominante é paralela ao corpo no contato inicial e ao levantar; e a posição da cauda é consistentemente para cima e há instabilidade de tronco.
21	Passada plantar consistente, coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar, liberação de dedos consistente, posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato inicial e ao levantar, a posição da cauda é consistentemente para cima e estabilidade de tronco consistente.

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

02/03/2021

ScholarOne Manuscripts



American Journal of Human Biology

Home

Author

Review

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

American Journal of Human Biology

Manuscript ID

AJHB-21-0078

Title

Effect of Alpinia zerumbet essential oil treatment associated with treadmill training after spinal injury in a chronic experimental model

Authors

Marcelino, Carlos

Prevalência e correlação das comorbidades por idade e sexo dos óbitos por COVID-19 no estado de Sergipe - Brasil: Parte I

Prevalence and correlation of comorbidities by age and sex of COVID-19 deaths in Sergipe - Brazil state: Part I

Prevalência y correlación de las comorbilidades por edad y sexo de lãs muretas de COVID-19 em estado de Sergipe - Brasil: Parte I

Kathlen Cruz Almeida¹, Carlos Henrique da Silva Marcelino¹, Laiany Lima da Cruz¹, Luís Augusto Silva Rocha¹, Fabiana Conceição de Oliveira Santos Falcão¹, Júlia Caroline Santos¹, Sônia Oliveira Lima^{1,2}, Edna Aragão Farias Cândido^{1,2*}.

RESUMO

Objetivo: Evidenciar a prevalência e sua correlação com as comorbidades por idade e sexo dos óbitos confirmados por COVID-19 no estado de Sergipe-Brasil. **Métodos:** O estudo retrospectivo e transversal foi realizado em 28/06/2020 com dados da Vigilância Epidemiológica de Sergipe, analisados pelo teste Qui-quadrado com nível de significância de $p > 0.05$. Foram 620 óbitos com 73,06% associados a comorbidades. **Resultados:** O sexo masculino (53,02%) prevaleceu Hipertensão (30,59%), seguido de Diabetes (28,02%) e Cardiopatias (10,8%). No sexo feminino (46,08%) a prevaleceu foi semelhante, Hipertensão (30,95%), Diabetes (28,37%) e Cardiopatias (12,32%). Os óbitos acima de 50 anos influenciaram moderadamente ($r = 0,65$; $p = 0,001$) e fortemente ($r = 0,8$; $p = 0,001$) acima dos 60 para os óbitos, independentemente das comorbidades. E tanto no sexo masculino ($r = 0,18$; $p = 0,003$) como feminino ($r = 0,23$; $p = 0,001$) essa correlação foi fraca para Hipertensão. Assim como para a associação de Hipertensão e Diabetes no sexo masculino ($r = 0,13$; $p = 0,043$) e feminino ($r = 0,16$; $p = 0,018$). **Conclusão:** Em Sergipe tanto os homens como as mulheres morrem de COVID-19, principalmente acima dos 60 anos e com comorbidades associadas como a hipertensão arterial.

Palavras-chave: Pandemia, COVID-19, Comorbidade, Óbito.

ABSTRACT

Objective: To evidence the prevalence and its correlation with comorbidities by age and sex of the deaths confirmed by COVID-19 in the state of Sergipe-Brazil. **Methods:** The retrospective and cross-sectional study was conducted on 06/28/2020 with data from Sergipe Epidemiological Surveillance, analyzed by the Chi-square test with a significance level
