

UNIVERSIDADE TIRADENTES
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

LAIRA MARIA MATIAS LISBOA

**CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLÓGICAS NEUROMOTORAS
APÓS TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia*
zerumbet EM MODELO MURINO**

Aracaju
2023

LAIRA MARIA MATIAS LISBOA

CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLÓGICAS NEUROMOTORAS
APÓS TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia*
zerumbet EM MODELO MURINO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Tiradentes como um dos
pré-requisitos para obtenção do
grau de Bacharel em Fisioterapia.

ORIENTADORA: Edna Aragão Farias Cândido

Aracaju
2023

CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLÓGICAS NEUROMOTORAS APÓS TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet* EM MODELO MURINO

Laira Maria Matias Lisboa

RESUMO

A lesão medular desencadeia alterações na funcionalidade da medula espinal. Dentre as manifestações clínicas, a mais recorrente é a espasticidade. A espasticidade é uma desordem sensório-motora decorrente da lesão no neurônio motor superior caracterizada pelo aumento do tônus muscular. Uma das estratégias para modular a espasticidade, há a implementação da fitoterapia, mais especificamente, o uso do fitomedicamento a base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz®). Assim, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a histomorfologia neuromotora após tratamento com o fitomedicamento a base do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*. Trata-se de um estudo Pré-clínico, randomizado e cego, que utilizou 42 ratos (Wistar) realizando compressão medular a nível de T9-T10. Os animais foram divididos em 3 grupos: Sham (submetidos apenas ao procedimento cirúrgico de acesso ao canal medular e sem lesão medular, Lesão (submetidos a lesão medular, porém sem nenhum tipo de intervenção) e OEAz® (submetidos a lesão medular e tratamento com OEAz® (0.05mg/2kg), com aplicação dérmica nos músculos gastrocnêmios). Após o período de tratamento os animais foram eutanasiados para retirada da musculatura com posterior realização das colorações. Para a análise da espasticidade foi utilizado a escala de *Ashworth* e para quantificar e avaliar as características histomorfológicas das fibras musculares foi utilizado o software ImageJ®. Os dados foram analisados pelo Programa GraphPad Prism 9.5. As análises estatísticas entre os grupos tratados e seu controle foram submetidos ao teste de ANOVA One-Way ou ANOVA Two-Way com pós teste Tukey, após normalização de dados, considerando $p < 0,05$. O grupo OEAz® apresentou melhora no grau de espasticidade, perímetro dos axônios motores e tamanho de feixe muscular. Concluiu-se que o tratamento com o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* promoveu redução do tônus muscular, interferiu no perímetro dos axônios motores e no tamanho do feixe muscular, deixando-o semelhante ao grupo sem lesão.

Palavras-chave: *Alpinia*; Espasticidade Muscular; Traumatismos da Medula Espinal.

HISTOMORPHOLOGICAL NEUROMOTOR CHARACTERISTICS AFTER TREATMENT WITH ESSENTIAL OIL OF *Alpinia zerumbet* IN A MURINE MODEL

ABSTRACT

Spinal cord injury triggers changes in spinal cord functionality. Among the clinical manifestations, the most recurrent is spasticity. Spasticity is a sensorimotor disorder resulting from upper motor neuron injury characterized by increased muscle tone. One of the strategies to modulate spasticity is the implementation of phytotherapy, more specifically, the use of a phytomedicine based on the essential oil of *Alpinia zerumbet* (EOAz®). Thus, the present study aims to characterize the neuromotor histomorphology after treatment with a phytomedicine based on the essential oil of *Alpinia zerumbet*. This is a pre-clinical, randomized and blind study, which used 42 rats (Wistar) performing spinal cord compression at the T9-T10 level. The animals were divided into 3 groups: Sham (submitted only to the surgical procedure to access the spinal canal and without spinal cord injury), Lesion (submitted to spinal cord injury, but without any type of intervention) and OEAz® (submitted to spinal cord injury and treatment with EOAz® (0.05mg/2kg), with dermal application in the gastrocnemius muscles). After the treatment period, the animals were euthanized to remove the muscles with subsequent coloring. For the analysis of spasticity, the Ashworth scale was used and to quantify and to evaluate the histomorphological characteristics of the muscle fibers, ImageJ® software was used. The data were analyzed using the GraphPad Prism 9.5 program. Statistical analyzes between the treated groups and their control were submitted to the One-Way ANOVA or Two-Way ANOVA test with post Tukey test, after data normalization, considering $p < 0.05$. The OEAz® group showed improvement in the degree of spasticity, perimeter of motor axons and size of muscle bundle. It was concluded that treatment with *Alpinia zerumbet* essential oil promoted a reduction in muscle tone, interfered with the perimeter of motor axons and the size of the muscle bundle, leaving it similar to the group without injury.

Keywords: *Alpinia*; Muscle spastic; Spinal Cord Injuries.

1 INTRODUÇÃO

A medula espinal é uma estrutura localizada dentro do canal medular e quando lesionada desencadeia desordens estruturais que repercutem na funcionalidade sensitiva e motora do indivíduo (FOUAD *et al.*, 2021). Este dano medular pode ser decorrente de um mecanismo extrínseco, que tem origem traumática (acidentes de trânsito, quedas, violência urbana) ou de um mecanismo intrínseco no qual resulta de um fator não traumático (infecções na medula espinhal, mielopatia da medula espinal, coágulos sanguíneos na região medular, patologias degenerativas) (BARCLAY *et al.*, 2019; COFANO *et al.*, 2019).

Em relação à incidência global da lesão medular (LM), de acordo com *Global Burden of Disease* (GBD) foi de 0,9 milhões de casos de LM total em 2019. Quanto às manifestações clínicas da LM, destacam-se: dor neuropática, disfunção cardiorrespiratória, paresia ou plegia, bexiga neurogênica, intestino neurogênico, lesão por pressão, disfunção do metabolismo ósseo e dano psicossocial (VALBUENA *et al.*, 2022). Já a espasticidade é uma desordem sensório-motora decorrente da lesão no neurônio motor superior caracterizada pelo aumento do tônus muscular e reflexo de estiramento (BILLINGTON *et al.*, 2022).

Morfologicamente, a musculatura espástica em comparação a musculatura sadia apresenta sarcômero com menor comprimento, fibras musculares e colágeno com maior rigidez e maior quantidade e menor qualidade de material na matriz extracelular (FORAN *et al.*, 2005). Além disso, tem redução do volume e comprimento muscular (MALAYA *et al.*, 2007). Essas alterações histomorfológicas podem implicar nas atividades motoras do indivíduo como: pentear o cabelo, alimentar-se, vestir-se, deslocar-se e deambular.

Com a finalidade de controlar a espasticidade muscular, os tratamentos podem ser não farmacológicos (fisioterapia, estimulação transcraniana por corrente contínua, além de procedimentos cirúrgicos como a neurotomia periférica) e farmacológicos (neurotoxina botulínica A, baclofeno, tizanidina e dantrolene). Entretanto, esses recursos farmacológicos estão associados a

efeitos colaterais como sonolência, envolvimento no cognitivo, cefaléia, tontura, disartria, náusea, fadiga, bradicardia (KHAN et al., 2019; GOYAL et al., 2022; CHO, 2023). Além disso, há os fitoterápicos.

A fitoterapia é baseada na utilização de componentes naturais para fins terapêuticos. Os fitoterápicos são utilizados para melhora de manifestações clínicas como a espasticidade. Quanto ao controle da espasticidade, destaca-se o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) (PÉREZ-ARREDONDO et al., 2016). Além do efeito na modulação do tônus muscular (MAIA et al., 2016), o OEAz reduz a potência de contração e frequência cardiovascular decorrente da diminuição de entrada de Ca²⁺ nos canais de Ca²⁺ de voltagem do tipo L (SANTOS et al., 2011).

Além disso, favorece para organização do colágeno e regressão das modificações na espessura do colágeno (CERQUEIRA et al., 2015) e também possui atuação na reversão das modificações do colágeno na fibrose muscular e aumento na expressão da caveolina tipo 1 em ratos (BATISTA et al., 2024). Assim, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a histomorfologia neuromotora após tratamento com óleo essencial de *Alpinia zerumbet* em modelo murino, com a finalidade de maximizar o tratamento dos músculos espásticos, no qual irá refletir na melhora da recuperação neurofuncional.

2 METODOLOGIA

Desenho e locais da pesquisa

Pré-clínico, randomizado e cego, com abordagem analítica quantitativa. O estudo foi realizado no Biotério, Laboratório de Estudo Biológicos e Produtos Naturais (LBPN), Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE), pertencentes ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP).

Aspectos Éticos e Animais

O projeto foi submetido para análise e aprovado sob respectivo protocolo: 030721R (Anexo 1). Foram utilizados 42 ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos, machos e fêmeas, com peso oscilando entre 250-300g, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Foram agrupados em número de 3 em gaiola de polipropileno padrão, sendo separados de acordo com gênero, colocados em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 3 grupos:

1. **Sham:** Submetidos apenas ao procedimento cirúrgico de acesso ao canal medular e sem lesão medular;
2. **Lesão:** Submetidos a lesão medular, porém não recebeu nenhum tipo de intervenção;
3. **OEAz®:** Submetidos a lesão medular e tratamento utilizando OEAz® (0.05mg/2kg), com aplicação dérmica nos músculos gastrocnêmios.

Procedimento Cirúrgico

É utilizado 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 relaxante muscular e anestésico (Cloridrato de Ketamina a 10% - 95mg/kg) e (Cloridrato de Xilazina a 2% - 12mg/kg) com aplicação intraperitoneal. Os animais foram anestesiados e colocados em decúbito ventral com exposição do dorso para realização da antisepsia na parte torácica com uso da solução de polivinilpirrolidona, logo após é realizada a tricotomia da região. Posteriormente, ocorreu uma incisão

de aproximadamente 5cm de comprimento de pele e tecido subcutâneo sob linha média da região torácica, com afastamento subperiosteal dos paravertebrais, para expor a coluna vertebral.

Para evidenciar o canal medular, foi realizada a localização das vértebras T9 e T10 por meio de palpação, e posteriormente realizado a laminectomia dos mesmos. Logo após foi reproduzido trauma mecânico por meio do aparelho estereotáxico modificado, confeccionado pelos pesquisadores é constituído de uma haste fina de ponta romba (01mm²) com peso de 70g localizado na parte superior, sendo colocado por 5 minutos.

Em seguida, ocorreu a suturação 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 colocados em gaiolas com água, ração e ambiente climatizado.

Protocolo de Tratamento

O protocolo de tratamento foi iniciado ao final do décimo quarto dia de pós-operatório, para desenvolvimento da espasticidade muscular, baseado nos achados de Li e Bennett (2003) e Murray et al. (2010). Após constatado a presença de espasticidade nos músculos gastrocnêmios, localizados nas patas traseiras dos animais, foi iniciado o protocolo de tratamento do grupo OEAz®, apenas com aplicações diárias do OEAz®, por via dérmica, na dosagem correspondente de acordo com o peso do animal durante 4 semanas.

Avaliação Clínica da Espasticidade

As avaliações foram realizadas com 1, 7, 14, 30 e 45 dias após a lesão. Para observação dos comprometimentos funcionais, na lesão aguda, subaguda e crônica. E quadro correspondente a hipotonia e hipertonia, semelhantes aos indivíduos acometidos de lesão medular espinhal. As avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador, amenizando possíveis variações na referida.

Escala de *Ashworth* Modificada

A escala de *Ashworth* Modificada (BOHANNON; SMITH, 1987; HAHM et al., 2015), foi utilizada para avaliação do grau de espasticidade muscular.

Esta escala apresenta escores que vão de 0 a 5, sendo escore zero (0) – tônus normal, escore um (1) - aumento do tônus no início ou final do arco de movimento, escore dois (2) – Aumento do tônus em menos de 50% do arco de movimento, escore três (3) - Aumento do tônus muscular em mais de 50% do arco de movimento, escore (4) - Partes em flexão ou extensão movidos com dificuldades, escore cinco (5) – Partes rígidas em flexão ou extensão.

Preparação das amostras para estudos histológicos e Fixação

Após finalizado o período de tratamento, os animais foram submetidos a eutanásia por meio de injeção letal, para remoção dos músculos gastrocnêmios das patas traseiras dos animais, nas junções musculotendínea. Finalizado a retirada, foi iniciado o processo de fixação, que consiste em evitar o processo de autólise celular, sendo os músculos submetidos imediatamente em formaldeído tamponado a 10% durante 48 horas, sendo realizado posteriormente a clivagem dos músculos em corte transversal, na espessura de 5mm, para seguimento no processamento histológico, que seguiu as etapas de: A primeira etapa foi a desidratação, realizada de forma progressiva quanto a graduação alcoólica (álcool 70%,80%,90% e álcool absoluto I (100%) e absoluto II (100%)), com 1h de duração em cada estação, com o objetivo de retirar a água presente no tecido. A segunda etapa foi a diafanização, para remoção completa do álcool no interior dos tecidos, utilizando o xilol I e II, uma hora em cada estação. Por fim, a terceira etapa foi a impregnação, que consiste na infiltração da parafina líquida no músculo para que o material adquira rigidez suficiente e seja possível a realização de cortes finos. Ao final do processamento histológico, seguiu-se para o procedimento de inclusão na parafina, com a finalidade de envolver o exterior do material biológico com a parafina líquida para formar blocos que posteriormente foram submetidos à microtomia.

Para a confecção das lâminas as seções histológicas foram confeccionadas em série (5 μ m) submetidos a resfriamento dos blocos. Posteriormente, foram colocadas em álcool a 20%, seguido de banho maria para facilitar o estiramento e assim, serem fixadas na lâmina de vidro. Após o processo de fixação do tecido à lâmina de vidro, foi aplicado o processo de

coloração por Hematoxilina-Eosina (HE), com a finalidade de visualizar os níveis de trofismo muscular e mensuração do perímetro axonal.

Obtenção e Análise das Imagens Microscópicas para Identificação dos Níveis de Trofismo Muscular e Diâmetro Axonal

Inicialmente, foi realizado as obtenções das imagens do tecido dos músculos gastrocnêmios (feixes musculares), em corte transversal, por meio de câmera fotográfica (Modelo Euromex CMEX5_WIFI), acoplada ao microscópio de luz polarizada, modelo triocular (Euromex iScope series), na ocular de 10x, distribuídos em três áreas distintas do ventre muscular (borda lateral esquerda, centro e borda lateral direita) utilizando o software Image Focus Alpha. Posteriormente, foi realizada a análise das imagens, por meio do software ImageJ®. Inicialmente, foi realizado a calibração do software para transformar os valores de pixels para micras. Em seguida, foi utilizado para quantificar o perímetro dos axônios e das fibras musculares, o modo freehand selection.

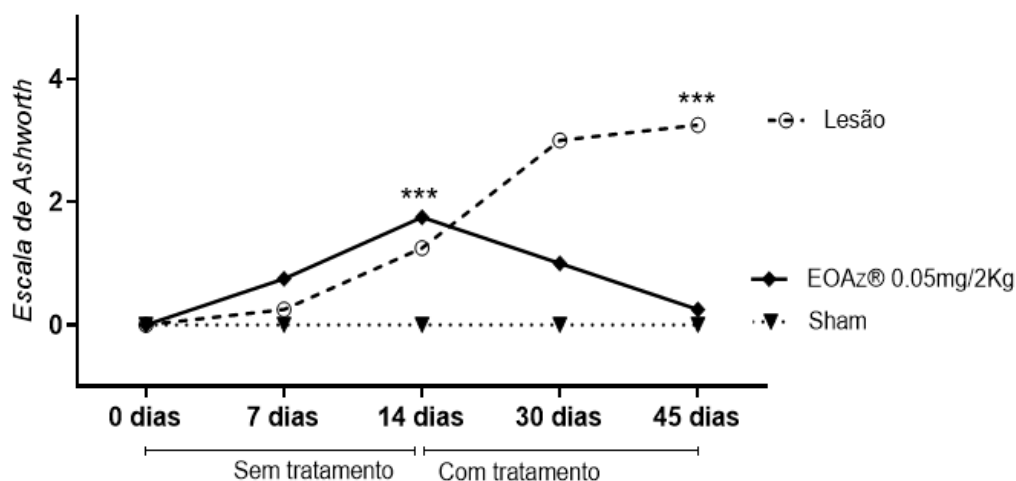
Análise estatística

Os dados foram tabulados em tabelas pelo Programa Microsoft Excel 2011. O Programa GraphPad Prism 9.5 foi utilizado para a análise estatística entre os grupos tratados e seu controle, onde se aplicou o teste de ANOVA One-Way ou Two-Way com pós teste Tukey, após normalização de dados, levando-se em consideração $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Os resultados seguintes, representados nas figuras, são decorrentes da análise do grau de espasticidade muscular, quantificação do trofismo muscular e perímetro de axônios motores vivos.

A figura 1 demonstra o grau de espasticidade muscular pós lesão medular, analisado mediante a escala de *Ashworth* em quatro períodos na linha de tempo de indução e tratamento da espasticidade.

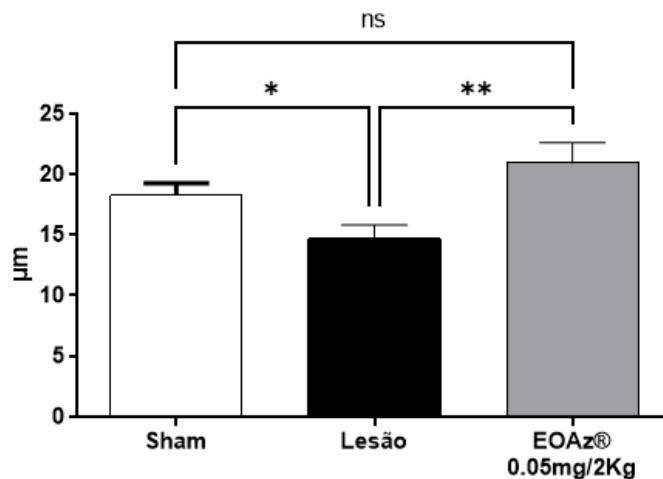


Comportamento da espasticidade em músculos espásticos, após tratamento ou não com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, em modelo murino de lesão medular.

Figura 1: Comportamento da espasticidade (*Escala de Ashworth*) de músculos espásticos em modelo murino de lesão medular, pós 30 dias de tratamento, ou não, com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* em concentração de 33% na dose de 0.05mg/2Kg. Teste ANOVA Two-way e pós teste Tukey, considerando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Entre o 1º e 14º dia de pós-operatório, os grupos se apresentaram semelhantes quanto ao seu nível de espasticidade. Ao final do 14º dia após cirurgia, foi observado que houve diferença significativa quanto a exacerbação da espasticidade nos grupos Lesão ($1,25 \pm 0,50$) e OEAz® ($1,75 \pm 0,50$) em relação ao grupo Sham ($p < 0,001$) que não apresentou espasticidade, aos quais apresentaram escores na escala de *Ashworth* que significa aumento do tônus muscular em menos da metade do arco de movimento. Finalizando o período de tratamento no 45º dia pós cirúrgico, ou seja, 30 dias de tratamento, encontrou-se um aumento constante do tônus muscular do grupo Lesão, com média $3,25 \pm 0,50$, apresentando escore acima de 3, que indica um aumento do tônus muscular em mais da metade do arco de movimento ($p < 0,001$). Já no grupo OEAz® houve redução significativa do tônus muscular ($0,25 \pm 0,50$), apresentando escore bem próximo ao 0 (tônus normal), semelhante estatisticamente ao grupo Sham. O grupo Sham, por sua vez, apresentou média de $0,00 \pm 0,00$, quando comparado com os grupos Lesão e OEAz®, que se manteve constante.

A figura 2 apresenta o perímetro de axônios motores vivos encontrados nos músculos gastrocnêmios. Foi evidenciado que os grupos Sham ($18,26 \pm 7,35$) e OEAz® ($20,92 \pm 10,96$), apresentaram axônios de maior perímetro em comparação ao grupo Lesão ($14,69 \pm 6,69$), de forma significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). Entretanto, quando comparados os grupos Sham e OEAz®, não foram identificadas diferenças significativas.



Perímetro do axônio motor em músculos espásticos, após tratamento ou não com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, em modelo murino de lesão medular.

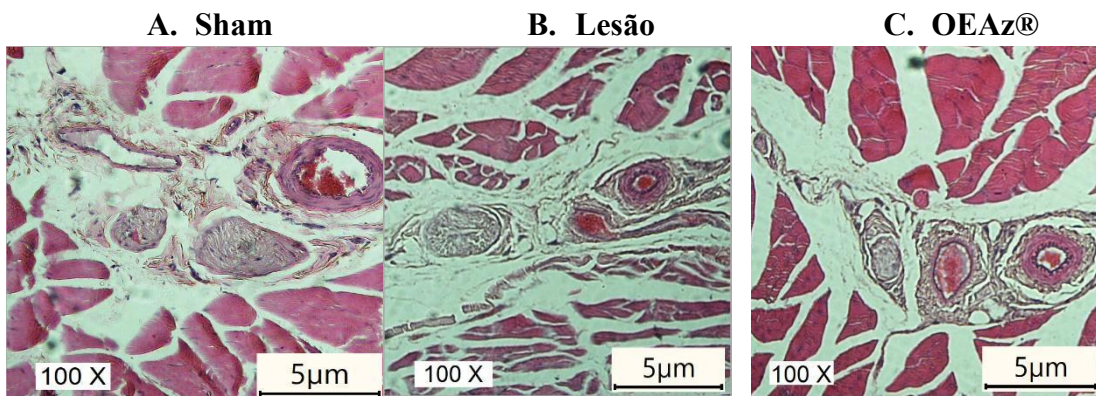
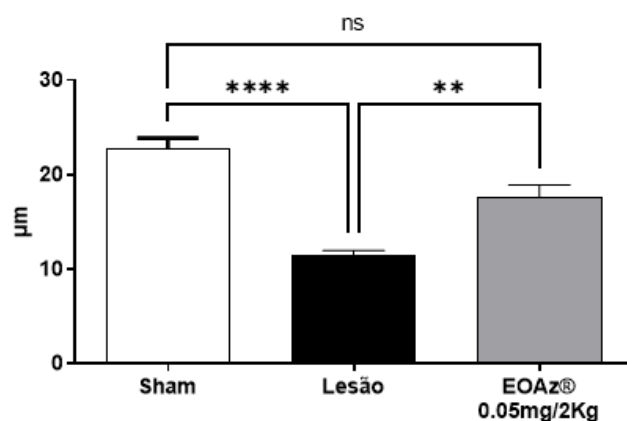


Figura 2: Perímetro de axônios motores vivos em músculos espásticos em modelo murino de lesão medular, pós 30 dias de tratamento, ou não, com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* em concentração de 33% na dose de 0.05mg/2Kg. Teste ANOVA One-way e pós teste Tukey, considerando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. A figura A apresenta feixes, axônios motores e artérias em músculos saudáveis do grupo Sham; a figura B apresenta feixes, axônios motores e artérias em músculos espásticos sem tratamento, o grupo Lesão e a figura C apresenta feixes, axônios motores e artérias em músculos espásticos com tratamento com OEAz®, o grupo OEAz®.

A figura 3 apresenta a análise quantitativa do trofismo muscular dos animais pós lesão medular. O grupo Lesão em comparação com os grupos Sham ($p<0,001$) e OEAz® ($p<0,01$) apresentou menor tamanho de feixe muscular. O tamanho de feixe muscular apresentou média de $11,47\pm 2,51$; por conseguinte, reflete diretamente em maior grau de hipotrofia muscular dos animais referente a esse grupo Lesão. Não houve diferenças significativas entre os grupos Sham e OEAz®.



Tamanho de feixe muscular espásticos, após tratamento ou não com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, em modelo murino de lesão medular.

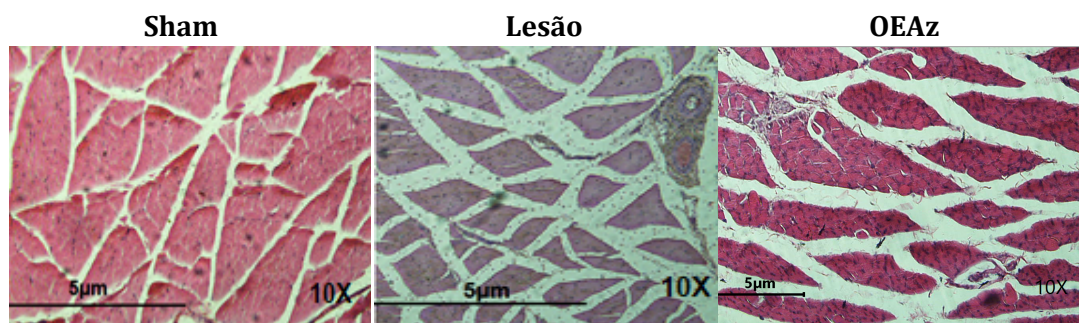


Figura 3: Tamanho de feixe muscular de músculos espásticos em modelo murino de lesão medular, pós 30 dias de tratamento ou não, com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* em concentração de 33% na dose de 0.05mg/2Kg. Teste ANOVA One-way e pós teste Tukey, considerando $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$.

4 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou as características histomorfológicas neuromotoras após tratamento com fitoterápico à base do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz®) nos músculos gastrocnêmios de ratos Wistar. O OEAz® é um fitoterápico que tem em sua composição a *Alpinia zerumbet*. Esta planta é nativa do leste asiático, comumente encontrada em regiões tropicais e além de modular a espasticidade, apresenta efeitos benéficos como: ação anti-inflamatória, ansiolítica, antifúngica, antioxidante e antimicrobiana (XIAO et al., 2020).

Encontrou-se no presente estudo que entre o 1º e 14º dia pós operatório os grupos se apresentaram semelhantes quanto ao seu nível de espasticidade, no entanto posteriormente esse período os grupos Lesão e OEAz obtiveram um aumento no tônus muscular. Isso pode ser explicado pois ao final de 14 dias pós lesão medular a espasticidade muscular é estabelecida (Li e Bennett, 2003; Murray et al.; 2010).

No presente estudo o grupo OEAz® obteve uma redução significativa no grau de espasticidade em comparação com o grupo Lesão. Resultado semelhante foi evidenciado no estudo de Cerqueira et al. (2015), no qual demonstrou que houve redução do tônus muscular dos animais submetidos ao processo de lesão medular, ao serem tratados com o OEAz®. Essa modulação tônica é justificada pelos estudos de Santos et al. (2011) que os canais de Ca^{2+} L foram modulados pelo OEAz, de forma dose dependente; e os resultados de Cerqueira et al. (2015) e Batista et al. (2022) que apresentaram melhora no tipo de colágeno (tipo III) em ratos com espasticidade ou com imobilização muscular, após serem tratados com OEAz.

Segundo Muzio e Cascella (2022), os axônios participam da transmissão dos impulsos nervosos e a velocidade da propagação desse estímulo é dependente do diâmetro do axônio e da bainha de mielina. Quanto ao perímetro dos axônios motores vivos, este estudo demonstrou que o grupo OEAz® apresentou aumento no perímetro em relação ao grupo Lesão, assim reflete na melhora da movimentação dos animais. Isso pode ser justificado através do estudo de Li e Leung (2015), ao qual demonstrou a preferência dos oligodendrócitos por realizar a remielinização em axônios de perímetros

maiores o que proporciona qualidade da transmissão dos impulsos nervosos. Além disso, nesse estudo foi observado que o grupo OEAz® apresentou perímetro semelhante ao grupo Sham. Sendo assim, ao considerar o grupo Sham como detentor de impulso nervoso adequado, associa-se que da mesma maneira ocorre com o grupo OEAz®.

Esse estudo revelou que os animais presentes no grupo tratado com OEAz® obteve um aumento significativo no tamanho dos feixes musculares, em contrapartida, o grupo Lesão apresentou um tamanho menor de feixe muscular, isto pode sugerir menor utilização da musculatura pois, segundo Foran et al. (2005), a análise do tamanho de feixe muscular da musculatura espástica determina o padrão de utilização da musculatura e a diminuição do tamanho desses feixes revela uma redução do uso da musculatura do animal. Assim como, Smith et al. (2013) identificou que a massa muscular se adequa em relação aos graus de resposta do uso ou desuso da musculatura.

Estrada-Bonilla et al. (2020) verificou uma relação entre trofismo e movimento ao observar que os ratos com redução da massa muscular tiveram um pior desempenho funcional. Isso sugere que os resultados do presente estudo também são reforçados pelos estudos de Cerqueira et al (2015) e Batista et al. (2022) que apresentaram melhora da marcha; assim como Batista et al. (2022) que evidenciou melhora na rotação de pata, aceleração e velocidade dos movimentos das patas traseiras desses ratos tratados com OEAz. E segundo Batista et al. (2024), tratamento por 30 dias em músculos contraturados melhoram o colágeno total, assim como melhora a expressão gênica da caveolina tipo I, vinculada aos canais de Ca^{2+} L. Desta forma os estudos apresentados corroboram com os resultados obtidos na presente pesquisa.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento com fitomedicamento a base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* promoveu alterações histomorfológicas da musculatura espástica, tais como, redução do tônus muscular nos animais com

espasticidade, interferência no perímetro dos axônios motores e no tamanho do feixe muscular, deixando-o semelhante ao grupo sem lesão.

REFERÊNCIAS

BARCLAY, L.; NEW, P. W.; MORGAN, P. E.; GUILCHER, S. J. T. Satisfaction with life, health and well-being: comparison between non-traumatic spinal cord dysfunction, traumatic spinal cord injury and Australian norms. **Spinal Cord Series Cases**. 5: 50. 2019.

BATISTA, T. S. C.; BARROS, G. S.; DAMASCENO, F. C., CÂNDIDO, E. A. F.; BATISTA, M. V. A. Chemical characterization and effects of volatile oil of *Alpinia zerumbet* on the quality of collagen deposition and caveolin-1 expression in a muscular fibrosis murine model. **Brazilian Journal of Biology**. 84: e253616. 2024.

BATISTA, T. S. C.; OLIVEIRA, A. F. R.; SANTANA, L. B.; NASCIMENTO, V.; CÂNDIDO, E. A. F.; BATISTA, M. V. A. Gait analysis with muscular fibrosis and treatment with *Alpinia zerumbet* essential oil in immobilized rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 94 (2): e20211164. 2022.

BILLINGTON, Z. J.; HENKE, A. M.; GATER, D. R. Spasticity Management after Spinal Cord Injury: The Here and Now. **Journal of Personalized Medicine**. 12 (5): 808. 2022.

BOHANNON, R. W.; SMITH, M. B. Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. **Physical Therapy**. 67 (2): 206 - 7. 1987.

CERQUEIRA, F. L.; ALBUQUERQUE Jr., R. L. C.; ZINI, C. A.; CARAMAO, E. B., CÂNDIDO, E. A. F. 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**. 4 (10): 127-206. 2015.

CHO, S. R. Intrathecal Baclofen Therapy: Pros and Cons. **Annals of Rehabilitation Medicine**. 47 (1): 1-3. 2023.

COFANO, F.; BOIDO, M.; MONTICELLI, M.; ZENGA, F.; DUCATI, A.; VERCELLI, A.; GARBOSSA, D. Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. 20 (11): 2698. 2019.

DING, W.; HU, S.; WANG, P.; KANG, H.; PENG, R.; DONG, Y.; LI, F. Spinal Cord Injury: The Global Incidence, Prevalence, and Disability From the Global Burden of Disease Study 2019. **Spine (Phila Pa 1976)**. 47 (21): 1532 - 1540. 2022.

ESTRADA-BONILLA, Y. C.; TOMÉ, P. A.; FATURI, F. M.; MENDES-ZAMBETTA, R.; LEPESTEUR-GIANLORENÇO, A. C.; CROTI, G.; JONES, T. A.; RUSSO, T. L. Compensatory neuromuscular junction adaptations of forelimb muscles in focal cortical ischemia in rats. **Brain and Behavior**. 10 (3): e01472. 2020.

FORAN, J. R.; STEINMAN, S.; BARASH, I.; CHAMBERS, H. G.; LIEBER, R. L. Structural and mechanical alterations in spastic skeletal muscle. **Developmental Medicine & Child Neurology**. 47 (10): 713 - 7. 2005.

FOUAD, K.; POPOVICH, P. G.; KOPP, M. A.; SCHWAB, J. M. The neuroanatomical-functional paradox in spinal cord injury. **Nature Reviews Neurology**. 17 (1): 53-62. 2021.

GOYAL, L.; MALLICK, D.; ZAPATA, M. R.; YASHI, K.; CHOURASIA, P.; SURANI, S. Tizanidine Toxicity From Ciprofloxacin: A Cautionary Tale. **Cureus**. 14 (12): e32492. 2022.

HAHM, S. C.; YOON, Y. W.; KIM, J. High-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation alleviates spasticity after spinal contusion by inhibiting activated microglia in rats. **Neurorehabilitation & Neural Repair**. 29 (4): 370 - 81. 2015.

KHAN, F.; AMATYA, B.; BENSMAIL, D.; YELNIK, A. Non-pharmacological interventions for spasticity in adults: An overview of systematic reviews. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**. 62 (4): 265 - 273. 2019.

LI, N.; LEUNG, G. K. K. Oligodendrocyte Precursor Cells in Spinal Cord Injury: A Review and Update. **Biomed Research International**. 2015: 235195. 2015

LI, Y.; BENNETT, D. J. Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. **Journal of Neurophysiology**. 90 (2): 857 - 69. 2003.

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 & Clinical Pharmacology & Toxicology**. 118 (1): 58 - 62. 2016.

MURRAY, K. C.; NAKAE, A.; STEPHENS, M. J.; RANK, M.; D'AMICO, J.; HARVEY, P. J.; LI, X.; HARRIS, R. L.; BALLOU, E. W.; ANELLI, R.; HECKMAN, C. J.; MASHIMO, T.; VAVREK, R.; SANELLI, L.; GORASSINI, M. A.; BENNETT, D. J.; FOUAD, K. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors. **Nature Medicine**. 16 (6): 694-700. 2010.

MUZIO, M. R.; CASCELLA, M. Histology, Axon. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**. 2023.

OSBORN, J. W.; TAYLOR, R. F.; SCHRAMM, L. P. Chronic cervical spinal cord injury and autonomic hyperreflexia in rats. **American Journal of Physiology**. 258 (1 Pt 2): R169-74. 1990.

PÉREZ-ARREDONDO, A.; CÁZARES-RAMÍREZ, E.; CARRILLO-MORA, P.; MARTÍNEZ-VARGAS, M.; CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N.; COBALLASE-URRUTIA, E.; ALEMÓN-MEDINA, R.; SAMPIERI, A.; NAVARRO,

L.; CARMONA-APARICIO, L. Baclofen in the Therapeutic of Sequele of Traumatic Brain Injury: Spasticity. **Clinical Neuropharmacology**. 39 (6): 311 - 319. 2016.

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

SMITH, L. R.; MEYER, G.; LIEBER, R. L. Systems analysis of biological networks in skeletal muscle function. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**. 5 (1): 55 - 71. 2013.

TORRES, B. B. J.; SILVA, C. M. O.; ALMEIDA, Á. E. R. E.; 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [Internet]**. 62 (1): 92 - 9. 2010.

VALBUENA, A. D.; GATER, D. R. Jr.; ALVAREZ, G. Concomitant Brain Injury and Spinal Cord Injury Management Strategies: A Narrative Review. **Journal of Personalized Medicine**. 12 (7): 1108. 2022.

XIAO, T.; HUANG, J.; Wang X, Wu L, Zhou X, Jiang F, He Z, Guo Q, Tao L, Shen X. *Alpinia zerumbet* and Its Potential Use as an Herbal Medication for Atherosclerosis: Mechanistic Insights from Cell and Rodent Studies. **Lifestyle Genomics**. 13 (5): 138 - 145. 2020.

ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Nanoalpinia: Uma nova formulação para o tratamento da espasticidade", registrada com o nº030721R, sob a responsabilidade de Edna Aragão Farias Cândido, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi Aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 01/12/2021.

| | |
|-------------------------|--|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa |
| Vigência da autorização | 15/12/2021 a 01/11/2023 |
| Espécie/linhagem/raça | <i>Rattus norvegicus</i> / Rato / Wistar |
| Nº de Animais | 42 ratos |
| Peso/idade | Peso: 250 a 300g / Idade: 2 a 3 meses |
| Sexo | Machos (21) e Fêmea (21) |
| Origem | Biotério da Universidade Tiradentes |

Aracaju, 01 de dezembro de 2021

UNIVERSIDADE TIRADENTES
Maria Julia Nardelli
Prof.ª Maria Julia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal

Maria Julia Nardelli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT